

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude et caractérisation de la réponse à long terme des kératinocytes normaux et immortalisés aux stress UVB

Devillers, Jean-Yves

Award date:
2011

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Étude et caractérisation de la réponse à long terme des kératinocytes
normaux et immortalisés aux stress UVB**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Jean-Yves DEVILLERS

Janvier 2011



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Étude et caractérisation de la réponse à long terme des kératinocytes
normaux et immortalisés aux stress UVB**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Jean-Yves DEVILLERS

Janvier 2011

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude et caractérisation de la réponse à long terme des kératinocytes normaux et immortalisés aux stress UVB

DEVILLERS Jean-Yves

Résumé

Lors de ce travail, nous avons comparé deux modèles d'expositions répétées aux stress UVB chez des kératinocytes immortalisés (N-hTERT) ou chez des kératinocytes normaux (NHK).

Nous avons étudié après les stress l'apparition de marqueurs de sénescence (activité SA β -gal, arrêt de prolifération, expression de gènes associés à la sénescence) ou de marqueurs de différenciation du kératinocyte (expression de marqueurs de différenciation précoce ou tardive des kératinocytes). Nous avons montré et confirmé que le modèle sur N-hTERT induisait une différenciation tardive et que le modèle sur NHK induisait une sénescence prématurée.

Afin de mieux caractériser les changements d'expression génique présents dans ces deux modèles, nous avons réalisé une étude par PCR en temps réel sur carte microfluidique spécialement conçue pour permettre l'analyse de l'expression de 92 gènes associés à la physiologie de la peau et de 4 gènes de référence.

Enfin, nous avons également utilisé cette carte microfluidique pour étudier les changements d'expression génique présents lors du photovieillissement de la peau et nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux obtenus dans les deux modèles de stress *in vitro*.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2011

Promoteur: F. Debacq-Chainiaux

Arrivé au terme de ce mémoire, il est temps de remercier les personnes qui ont permis cette réalisation.

Pour commencer, je voudrais remercier l'URBC dans son ensemble pour m'avoir permis d'effectuer mon mémoire et toutes mes manipulations dans une ambiance conviviale.

Ensuite, ma promotrice, Florence Chainiaux pour m'avoir guidé durant tout ce mémoire sans compter les précieuses corrections qui m'ont été fournies.

Je remercie également la sympathique équipe des GRAS sur laquelle on peut toujours compter pour avoir un peu d'aide.

Merci aux autres mémorants, ainsi que tous les autres membres du labo.

Je voudrais également remercier le petit Lio, JPP, Seb et Geoff pour les séances de relaxation dans lesquelles une fois par semaine nous faisons l'oiseau, l'ours, la tortue sans oublier l'écrevisse.

Je remercie également Maxime qui m'a permis de garder un œil sur la sphère aux étoiles durant ces années.

Je voudrais également remercier Maverick et Kojack qui m'ont souvent aidé à me sortir de situations difficiles.

Pour finir, je voudrais remercier mes parents qui ont fait des sacrifices afin que je puisse terminer mes études et ce mémoire.

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide Ribonucléique
ALM	Acral Lentiginous Melanoma
ADNc	ADN complémentaire
$O_2^{\cdot -}$	Anion Superoxyde
ARNm	ARN messenger
BCC	Basal Cell Carcinomas
Ct	Cycle Threshold
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CDKI	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
CPDs	Dimères Pyrimidines-Cyclobutanes
SDS	Dodécylsulfate de sodium
EGF	Epidermal Growth Factor
GGR	Global Genome Repair
HKGS	Human Keratinocyte Growth Supplement
hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase
K	Kératine
N-hTERT	Kératinocytes immortalisés
NHOK	Kératinocytes Oraux Normaux Humains
Keratinocyte-SFM	Keratinocyte-Serum Free Medium
MMP	Métalloprotéinase Matricielle
NMSC	Non Melanoma Skin Cancer
NHK	Normal Human Keratinocyte
NER	Nucleotide Excision Repair
O_2^{\cdot}	Oxygène Singulet
H_2O_2	Peroxyde d'Hydrogène
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
pRb	Protéine du Rétinoblastome
6-4 PPs	Pyrimidines (6-4) Pyrimidone
RGP	Radial Growth Phase
OH^{\cdot}	Radical Hydroxyle
UV	Rayons Ultraviolets
ROS	Reactive Oxygen Species
RIN	RNA Integrity Number
SA β -gal	Senescence Associated β -galactosidase
SPR	Small proline-rich proteins
SCC	Squamous Cell Carcinomas
SSM	Superficial Spreading Melanoma
TLDA	TaqMan Low Density Array
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TERC	Telomerase RNA Component

Liste des abréviations

TCR	Transcription Coupled Repair
VGP	Vertical Growth Phase

Table des matières

INTRODUCTION	1
1.1 Introduction générale	1
1.2 Structure et fonction de la peau	1
1.2.1 L'épiderme	2
1.2.2 La jonction dermo-épidermique	3
1.2.3 Le derme	3
1.2.4 L'hypoderme	4
1.3 Les kératinocytes	4
1.4 Les protéines de la couche cornée	6
1.5 Les kératines	7
1.6 Les UV et leurs conséquences	8
1.6.1 Le rayonnement solaire	8
1.6.2 Dommages induits par les UV	9
1.6.3 Systèmes de défense	11
1.6.4 Les cancers cutanés	12
1.7 Le photovieillissement	13
1.8 La sénescence	14
1.9 Les marqueurs de la sénescence	14
1.9.1 Le raccourcissement des télomères	14
1.9.2 L'arrêt du cycle cellulaire	15
1.9.3 L'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence	17
1.10 La sénescence du kératinocytes	17
1.11 Sénescence induite prématurément par des stress	18
1.12 Objectifs du mémoire	18
MATÉRIEL ET MÉTHODES	20
2.1 Culture cellulaire	20
2.1.1 Caractéristiques des lignées utilisées	20
2.1.2 Culture et repiquage	20
2.1.3 Exposition aux UVB	22

2.2	Extraction d'ARN, Rétro-transcription et PCR en temps réel	23
2.2.1	Extraction de l'ARN	23
2.2.2	Rétro- transcription	23
2.2.3	PCR semi-quantitative en temps réel	24
2.2.4	Cartes microfluidiques TaqMan®(TLDA : TaqMan Low Density Array)	25
2.3	Analyse des protéines (extraction – dosage – western blot – immunofluorescence)	25
2.3.1	Extraction des protéines	25
2.3.2	Dosage des protéines par la méthode Bradford.....	26
2.3.3	Western Blot SDS PAGE	26
2.3.4	Immunofluorescence	27
2.4	Test de survie cellulaire : Test MTT	28
2.5	Détection de l'activité β-galactosidase associée à la sénescence (SAβ-gal)	29
2.6	Analyses statistiquesRésultats	29
	Résultats	30
3.1	Étude des effets à long terme des UVB sur les kératinocytes immortalisés (N-hTERT)	30
3.1.1	Mesure de la survie cellulaire des N-hTERT suite aux expositions répétées aux UVB.....	30
3.1.2	Mesure de l'apoptose des N-hTERT suite aux expositions répétées aux UVB.....	31
3.1.3	Étude des marqueurs de sénescence	31
3.1.4	Étude des marqueurs de la différenciation des kératinocytes	33
3.1.5	Analyse de l'expression génique par cartes microfluidiques TaqMan®	34
3.1.6	Confirmation de l'analyse des cartes microfluidiques TaqMan® par PCR en temps réel	35
3.2	Étude des effets à long terme des UVB sur des kératinocytes humains normaux (NHK)	36
3.2.1	Mesure de la survie cellulaire des NHK suite aux expositions répétées aux UVB	36
3.2.2	Mesure de l'apoptose des NHK suite aux expositions répétées aux UVB	36
3.2.3	Étude des marqueurs de la sénescence.....	37
3.2.4	Étude des marqueurs de différenciation des kératinocytes	38
3.2.5	Analyse de l'expression génique par cartes Microfluidiques TaqMan®	39
3.2.6	Confirmation de l'analyse des cartes microfluidiques par PCR en temps réel	40
3.3	Variation transcriptomique au cours du photovieillissement	40
3.3.2	Confirmation de l'analyse des cartes Microfluidiques par Real-Time PCR	41
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	42
	BIBLIOGRAPHIE	49

1.Introduction

1.1 Introduction générale

Le vieillissement est un phénomène inévitable qui nous fait passer de l'état de nourrisson à celui de retraité en passant par les étapes intermédiaires que sont l'écolier, l'étudiant et le travailleur. Pour cette raison, l'amélioration de la qualité de vie des personnes âgées ainsi que la prévention des maladies liées à l'âge sont devenues les principales attentions de la recherche sur le vieillissement. Parmi les différents modèles disponibles pour étudier le vieillissement, la peau offre plusieurs avantages qui font d'elle un modèle particulièrement intéressant. Premièrement, la peau est un organe facilement accessible, permettant l'exécution de tests non invasifs. De plus, la peau constitue l'organe le plus important en taille de notre organisme et représente une barrière physique entre les organes internes et les agressions environnementales parmi lesquelles on retrouve les radiations ultraviolettes qui sont l'une des agressions les plus importantes puisqu'elles peuvent avoir un impact sur le vieillissement de la peau. Enfin, lors du vieillissement d'un organisme, le taux d'hormones circulant dans le sang subit une variation qui se reflète sur l'état de vieillissement de la peau. C'est pour ces raisons, confirmées par des résultats expérimentaux que Zouboulis et al ont écrit que « la peau représentait le miroir du processus de vieillissement de l'organisme humain », et ce, spécialement en ce qui concerne le vieillissement des os et des tissus élastiques (Makrantonaki and Zouboulis, 2007).

La peau est un organe possédant plusieurs structures et types cellulaires différents et son vieillissement est complexe. En effet, le vieillissement de la peau est constitué de deux composantes qui sont étroitement liées. D'un côté, on retrouve le vieillissement intrinsèque possédant des origines génétiques et qui est caractérisé par une diminution de l'épaisseur du derme et de l'épiderme, ainsi que par une augmentation de la proportion de fibroblastes sénescents. Le vieillissement intrinsèque est semblable au vieillissement des autres organes (Wlaschek et al., 2001). De l'autre côté, le vieillissement extrinsèque dont les causes sont environnementales est caractérisé par une augmentation de l'épaisseur du derme et de l'épiderme associée à une augmentation du nombre de fibroblastes sénescents. Parmi les causes environnementales responsables de ce type de vieillissement, on retrouve principalement les rayons ultraviolets (UV), c'est pour cette raison que le vieillissement extrinsèque est également appelé « photo-vieillissement » (Wlaschek et al., 2001).

Les UV, même s'ils ne représentent que 5 % des radiations émises par le soleil, sont impliqués dans la plupart des pathologies liées aux expositions solaires. Ainsi, les principales conséquences des UV sur la peau sont le développement de cancers cutanés et le vieillissement de la peau.

1.2 Structure et fonction de la peau

La peau est l'organe le plus étendu de notre organisme puisqu'il possède une surface de l'ordre de 1,5 à 2,0 m², une épaisseur allant de 1 à 4 mm et représente approximativement 15 % du poids total chez un homme adulte (Murphy, 1997). Sa fonction

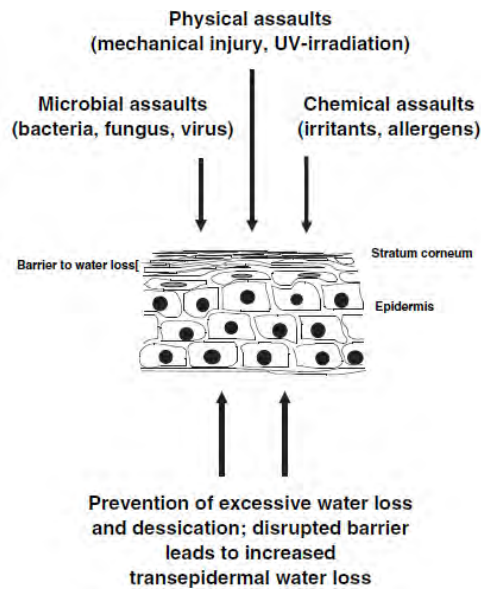


Figure 1 : Représentation des différentes fonctions de la peau (Proksch et al., 2008).



Figure 2 : Photographie d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (<http://webcampus.fundp.ac.be/courses/MMEDB151/document/HG/HisGen/HG-Rev-StKA-004-0-b.htm>).

principale est de protéger l'organisme contre la perte d'eau et les agressions physiques, chimiques et biologiques, telles que les blessures, les UV et les micro-organismes (Lippens et al., 2009) (figure 1). La fonction de cette barrière est établie au cours de l'embryogenèse suivant un programme complexe et finement contrôlé de stratification.

À côté de cela, la peau assure également d'autres fonctions tout aussi importantes comme la thermorégulation qui grâce aux glandes sudoripares et à une augmentation du débit sanguin dans les capillaires, permet la sudation. Une fonction sensorielle est également présente via un grand nombre de récepteurs capables de ressentir la température, la pression, la douleur et le toucher (Boulais and Misery, 2008). Toutes ces fonctions sont rendues possibles grâce à la présence de nombreuses structures élaborées qui permettent l'association de tissus de diverses origines comme les tissus épithéliaux, vasculaires, musculaires ou nerveux (Kanitakis, 2002).

Lorsqu'on observe la structure de la peau, on constate que celle-ci est constituée de quatre structures différentes qui s'organisent de la surface vers la profondeur comme suit : l'épiderme, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme. La structure de la peau présente des variations suivant les régions du corps. Ces variations concernent l'épaisseur qui peut varier de 1 à 4 mm, la distribution des différents appendices épidermiques ou la densité des mélanocytes. On retrouve également deux zones dépourvues de poils au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds alors que le reste du corps possède une pilosité variée (Murphy, 1997). Du point de vue de l'embryogenèse, l'épiderme et ses appendices ont une origine ectodermique alors que le derme possède des origines mésodermiques.

1.2.1 L'épiderme

Il s'agit de la couche la plus superficielle de la peau. L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé qui se renouvelle constamment. Les cellules de l'épiderme ne sont alimentées par aucun vaisseau sanguin ni lymphatique, mais par diffusion à partir du derme. On dénombre quatre types cellulaires différents présents dans l'épiderme : les kératinocytes qui représentent 90 à 95 % de l'ensemble des cellules présentent dans l'épiderme et qui possèdent des origines ectoblastiques. Les 5 à 10 % de cellules restantes sont divisées entre des mélanocytes provenant des crêtes neurales, des cellules de Langerhans provenant de la moëlle hématopoïétique et des cellules de Merkel dérivant des cellules souches de l'épiderme embryonnaire.

Les mélanocytes sont des cellules possédant un aspect étoilé ayant pour origine la crête neurale. Avant de migrer vers l'épiderme où ils vont produire la mélanine, les mélanocytes subissent un processus complexe de prolifération, de survie et de différenciation (Gray-Schopfer et al., 2007). De plus, les mélanocytes sont distribués de façon homogène parmi les kératinocytes basaux. Leur densité varie entre 500 et 2,000 cellules par mm² avec un ratio de 1 mélanocyte pour 4 à 10 kératinocytes. La fonction des mélanocytes est la synthèse des mélanines, eumélanines, neuromélanines et phéomélanines. Parmi ces quatre

composants, la mélanine est le principal pigment naturel de la peau et est produite via une activité enzymatique avant d'être stockée dans les mélanosomes. Ces derniers sont des organelles cytoplasmiques ovoïdes ou sphériques possédant quatre étapes de maturation qui vont de l'étape I à IV. En plus de leur rôle dans la pigmentation de la peau, les mélanines possèdent une importante fonction photoprotectrice qui protégera les kératinocytes de l'effet néfaste des UV. En effet, les mélanosomes matures vont être transférés vers les kératinocytes adjacents où ils vont assurer une protection du noyau (Kanitakis, 2002).

Les cellules de Langerhans sont des cellules mobiles, dendritiques et présentatrices d'antigènes qui sont présentes dans tout l'épithélium et qui représentent 3 à 6 % des cellules épidermiques. Elles ont pour origine la moëlle osseuse et plus précisément les précurseurs hématopoïétiques des cellules CD34⁺. Les cellules de Langerhans sont capables de capter les antigènes exogènes déposés sur la peau afin de les présenter à des cellules T inactives. Ce n'est qu'une fois mises en contact avec l'antigène que les cellules de Langerhans sont considérées comme actives (Girolomoni et al., 2002).

Les cellules de Merkel sont localisées dans la couche basale et constituent la population cellulaire minoritaire de l'épiderme. Leur fonction de mécanorécepteurs a été mise en évidence suite à l'observation de nombreux contacts entre elles et des axones sensoriels provenant du derme, formant ainsi des jonctions synaptiques. À côté de cela, les cellules de Merkel interviennent également dans la fonction du toucher (Lacour et al., 1991).

1.2.2 La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique constitue l'interface entre le derme et l'épiderme est une lame basale synthétisée par les fibroblastes du derme et les kératinocytes basaux. Sa fonction principale est de servir de support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme, mais également de contrôler les échanges métaboliques et le passage de nutriments entre le derme et l'épiderme. De plus, cette jonction constitue une barrière importante qui permet de réduire l'invasion des tissus par des cellules tumorales (Hussein, 2005). Afin de franchir cette barrière, les cellules tumorales doivent exprimer des métalloprotéinases matricielles (MMP) qui dégraderont la matrice extra-cellulaire (Hussein, 2005).

1.2.3 Le derme

Le derme est un tissu de soutien compressible et élastique qui est essentiellement constitué d'un tissu conjonctif. Ce tissu conjonctif se compose d'une matrice extracellulaire comprenant des fibres de collagènes de type I et III, des fibres élastiques et une substance fondamentale amorphe. Les cellules qui composent le derme sont essentiellement des fibroblastes dont le but est la synthèse de tous les constituants de la matrice extracellulaire du derme, mais également la synthèse de métalloprotéinases qui dégradent cette matrice et de leurs inhibiteurs (Kanitakis, 2002). Ceci permet de renouveler régulièrement la matrice extracellulaire. En fonction de sa localisation, le derme présente une variation de

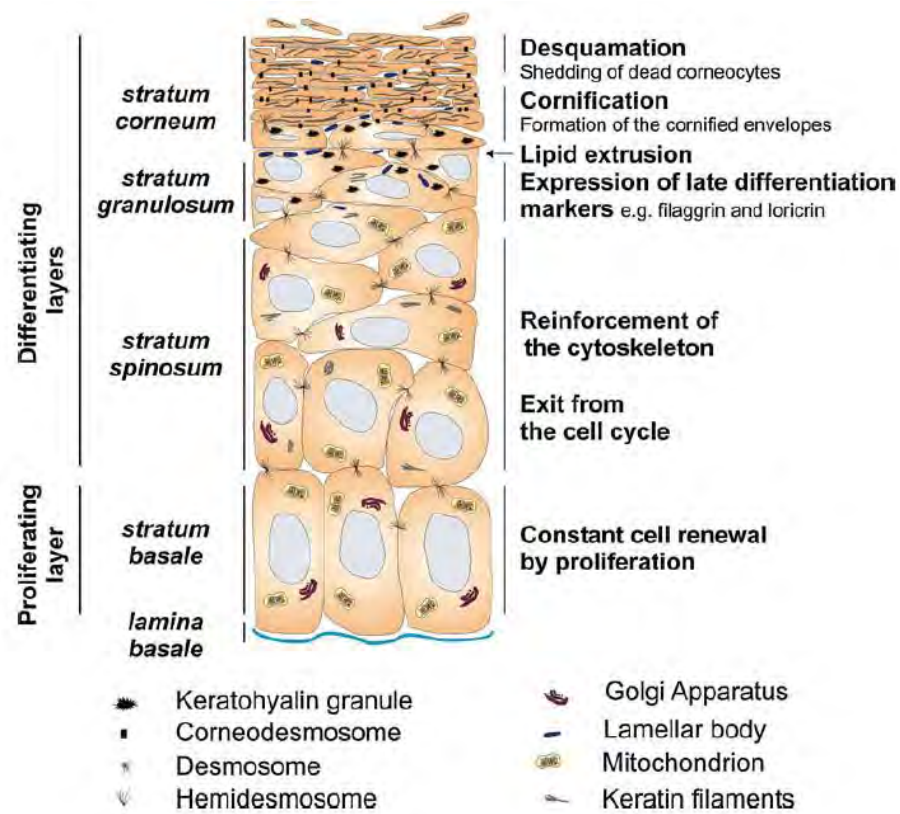


Figure 3 : Représentation des kératinocytes en différenciation, permettant la formation des différentes couches présentes dans l'épiderme (Lippens et al., 2009).

son épaisseur. Par exemple, il est beaucoup plus épais au niveau de la plante du pied qu'au niveau des paupières.

D'un point de vue histologique, le derme est constitué de deux parties distinctes : le derme superficiel et le derme profond. Le derme superficiel, également appelé papillaire forme des projections ascendantes qui sont en alternance avec les prolongements épidermiques. Cela augmente la surface de contact entre l'épiderme et le derme et par la même occasion, augmente l'adhérence entre ces couches. On y retrouve différents types cellulaires comme les fibroblastes ou les mastocytes, mais également des terminaisons nerveuses et des vaisseaux sanguins. Le derme papillaire est composé de fibres de collagène distribuées lâchement et de fibres élastiques disposées perpendiculairement à la jonction épidermique. En ce qui concerne le derme profond, également appelé réticulaire, il se compose d'un tissu dense de faisceaux de collagène sans orientation particulière et lié à des fibres élastiques (McMillan et al., 2003).

1.2.4 L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif richement vascularisé qui constitue la couche la plus profonde de la peau. On y retrouve également du tissu adipeux dont le rôle est la protection thermique et mécanique ainsi que le stockage de l'énergie sous forme de triglycérides. Le principal type cellulaire présent dans l'hypoderme est les adipocytes (Kanitakis, 2002).

1.3 Les kératinocytes

Les kératinocytes représentent approximativement 90 % des cellules de l'épiderme. La différenciation ou cornification des kératinocytes est un processus complexe permettant la mise en place de la couche cornée. En fonction de l'état de différenciation des kératinocytes, leur morphologie sera différente, induisant la formation de quatre couches cellulaires distinctes qui sont la couche basale (*stratum basale*), épineuse (*stratum spinosum*), granuleuse (*stratum granulosum*) et cornée (*stratum corneum*) (figure 3). Les kératinocytes sont constamment renouvelés grâce à une activité mitotique importante de la part des cellules souches situées au niveau de la couche basale et se différencient progressivement jusqu'à atteindre la couche cornée. Cet apport continu en nouvelles cellules compense les pertes dues à la desquamation et de maintenir une régénération constante de l'épiderme. En effet, la couche cornée qui est la couche qui nous protège des agressions externes, est constituée de cellules mortes qui desquament en permanence. Mais une division cellulaire continue comme celle-ci augmente le risque de mutation et par la même occasion l'apparition de cellules tumorales. Ce risque est d'autant plus grand que la peau est constamment soumise à diverses agressions comme les UV par exemple. Un autre inconvénient est que la multiplication des cellules entraînera inévitablement un vieillissement du tissu car les cellules saines ne peuvent se répliquer qu'un nombre limité de fois avant d'entrer en sénescence (Blasco, 2005).

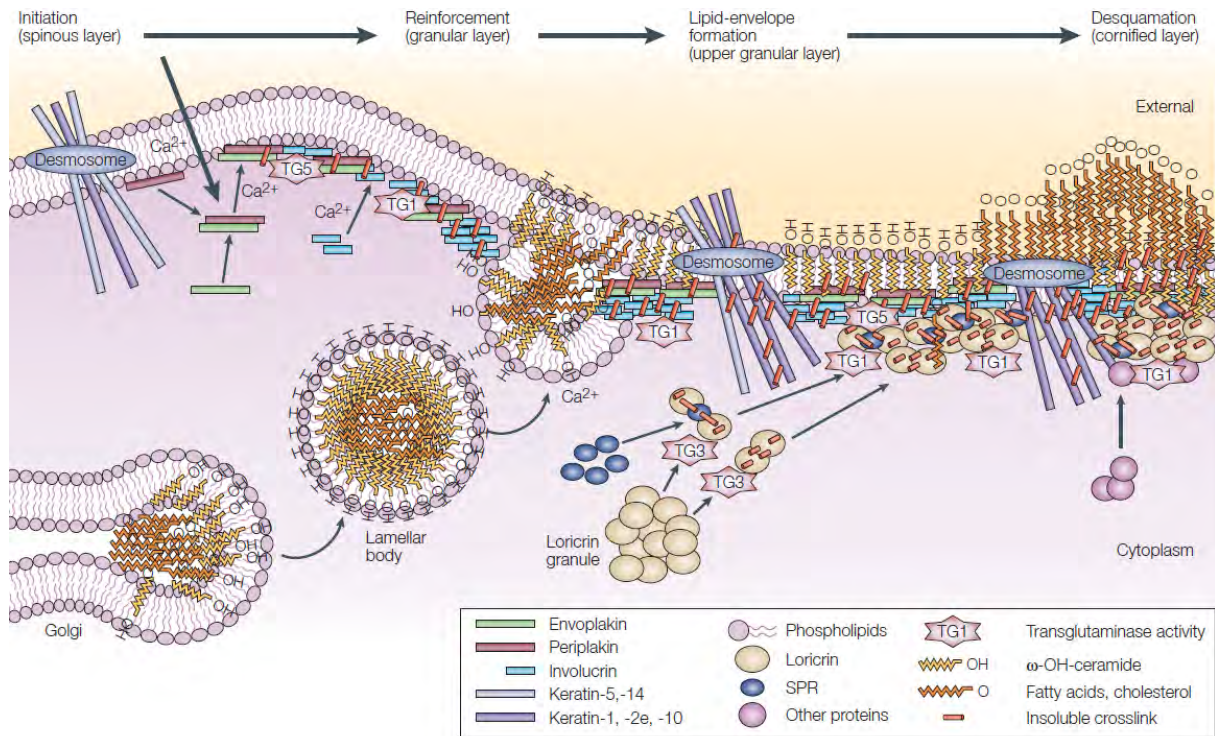


Figure 4 : Représentation de la couche cornée au cours des différentes étapes de son évolution. L'initiation de cette couche commence au niveau de la couche épineuse dans laquelle les protéines structurales de l'enveloppe sont synthétisées. Les transglutaminases 1 et 5 vont lier les protéines envoplakine et periplakine aux desmosomes et donc à la membrane cellulaire. La seconde étape est une étape de renforcement qui se déroule dans la couche granuleuse. Cette étape fait intervenir les transglutaminases 3 et 1 afin d'associer des SPR (small proline-rich proteins) à la loricrine. En plus de cela, des lipides sont attachés de manière covalente à l'enveloppe cornée. La dernière étape est la desquamation dans laquelle la transglutaminase 1 connecte certaines protéines à la structure de l'enveloppe (Candi et al., 2005).

Le cytosquelette des kératinocytes est essentiellement constitué de kératine qui est une protéine fibreuse faisant partie de la famille des filaments intermédiaires. Actuellement, 54 kératines différentes ont été découvertes, caractérisées et classées (Moll et al., 2008). Chaque kératinocyte exprime les polypeptides par paires de kératines, constitué d'une kératine acide et d'une basique. Le type de kératine exprimé va dépendre de l'état de différenciation de la cellule observée. Par exemple, au sein d'un épiderme normal, les kératinocytes basaux expriment essentiellement la kératine 5 et la kératine 14.

Au cours de leur déplacement entre la couche granuleuse et la couche cornée, la concentration intracellulaire en Ca^{2+} des kératinocytes augmentent. Cette augmentation permet l'activation de transglutaminases qui lient entre elles les différentes protéines de structure à l'intérieur de la membrane plasmique, permettant ainsi la formation de l'enveloppe cornée (Lippens et al., 2009). Cette cornification prend jusqu'à deux semaines (figure 4).

Premièrement, **la couche basale**, située à l'interface dermo-épidermique, est la couche à partir de laquelle les kératinocytes prolifèrent. Elle se compose d'une assise de cellules de forme cubique, possédant une taille variant entre 6 et 10 μm avec un noyau assez gros et un cytoplasme basophile. Afin de permettre l'ancrage des cellules perpendiculairement à la lame basale tout en conservant l'intégrité de la couche, de nombreuses structures d'ancrages comme les hémidesmosomes (liant les kératinocytes à la lame basale) et les desmosomes (liant les kératinocytes entre eux) sont présentes (figure 5) (Kanitakis, 2002). On retrouve au sein de la couche basale de nombreuses cellules souches qui peuvent se diviser continuellement et dont le but est de générer de nouveaux kératinocytes pour permettre le renouvellement de la peau.

La couche épineuse est constituée de kératinocytes de forme polyédrique et est généralement la couche la plus épaisse puisqu'elle contient cinq à sept assises cellulaires. Le nom de couche épineuse provient des nombreux desmosomes maculaires apparaissant sous forme d'épines. Les desmosomes interviennent dans la liaison des cellules épithéliales entre elles et permettent d'attacher les filaments intermédiaires de kératine à la surface cellulaire. Cette association desmosome-filaments intermédiaires de kératine forme un vaste réseau tridimensionnel dans l'épithélium. Les desmosomes sont constitués de deux protéines transmembranaires qui sont la desmoglérine et la desmocolline. Chacune de ces protéines est dépendante du calcium pour effectuer leur fonction d'adhérence (Presland and Dale, 2000).

La couche granuleuse comporte deux à quatre assises de cellules plus aplaties. À partir de cette couche, les grains d'Odland libèrent leur contenu dans l'espace intercellulaire. À ce niveau-ci, les kératinocytes commencent progressivement à mourir, les organites et les acides nucléiques sont complètement détruits. Au même moment, une enveloppe cornée composée principalement d'involucrène et de loricerine apparaît progressivement sur la face cytoplasmique de la membrane. Lorsque les kératinocytes atteignent cette couche, le réseau de filaments intermédiaires de kératine subit une évolution dans laquelle les kératines K5 et K14 sont progressivement remplacées par K1 et K10.

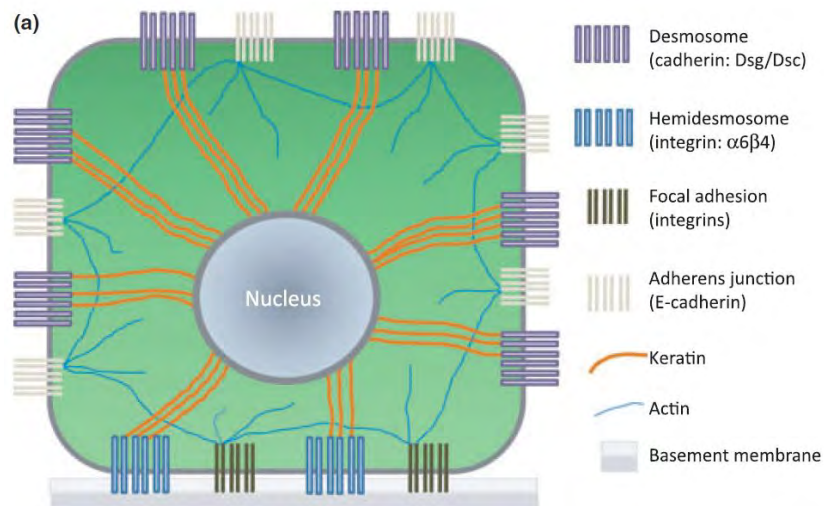


Figure 5 : Représentation des différentes structures d'ancrage présentes chez un kératinocyte (Suter et al., 2009).

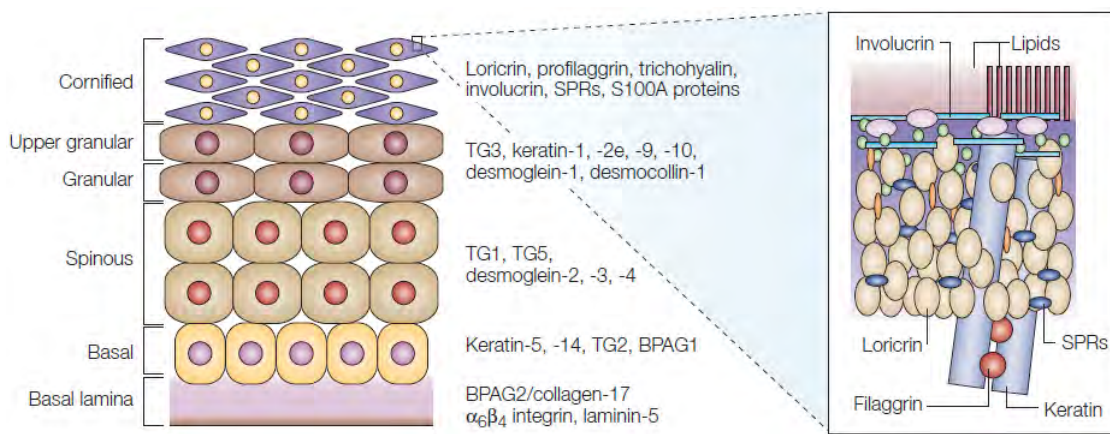


Figure 6 : Représentation des différentes couches présentes dans l'épiderme avec leurs protéines spécifiques (Candi et al., 2005).

La couche cornée représente le dernier stade de différenciation des kératinocytes et constitue l'interface entre l'air et les tissus, procurant une résistance contre les agressions physiques et chimiques. La couche cornée se compose de cornéocytes qui sont des kératinocytes morts complètement différenciés, de forme aplatie et dépourvu d'organites. Les cornéocytes se composent principalement de filaments intermédiaires de kératine entremêlés dans une matrice de filaggrine et entourés de lipides insolubles. Chaque cornéocyte est attaché à son voisin via des cornéodesmosomes qui proviennent de desmosomes modifiés durant la cornification des kératinocytes (Candi et al., 2005). La dégradation des cornéodesmosomes par des enzymes protéolytiques induit une perte continue de cellules à la surface de la peau, c'est le phénomène de desquamation (Serre et al., 1991). Pour compenser cette perte et ainsi conserver l'intégrité de la peau, les kératinocytes basaux fournissent constamment de nouveaux kératinocytes.

1.4 Les protéines de la couche cornée

La couche cornée se compose de différentes protéines qui lui permettent d'assurer correctement son maintien et sa fonction (figure 6).

Premièrement, **la filaggrine** qui provient de « filament aggregating protein », est le produit d'un complexe protéique plus large, la profilaggrine (>400 kDa). Dans un premier temps, la profilaggrine est hautement phosphorylée et s'accumule dans les granules de kératohyaline présent dans les kératinocytes de la couche granuleuse. Au cours de la cornification, la profilaggrine est déphosphorylée et clivée en plusieurs monomères de filaggrine (Resing et al., 1993). Comme dit précédemment, la filaggrine se lie à d'autres protéines de l'enveloppe cornée afin d'y maintenir sa structure.

La filaggrine a la capacité de s'associer avec les filaments intermédiaires et notamment avec les filaments de kératine afin de former des agrégats dans lesquels les filaments sont correctement alignés (Steinert and Marekov, 1995). Cependant, la filaggrine ne s'associe pas avec les autres composants du cytosquelette. La formation des agrégats filaggrine-kératine induirait un changement dans la forme cellulaire qui part d'une cellule ovoïde vers une cellule aplatie dans laquelle les filaments de kératines seraient alignés parallèlement à la surface de l'épiderme (Candi et al., 2005). À côté de cela, la filaggrine a un temps de demi-vie assez court qui est de l'ordre de 6 heures et sa dégradation libérera des acides aminés hydrophiles qui sont essentiels pour la rétention d'eau et donc l'osmorégulation (Candi et al., 2005). Au niveau de la couche cornée, la filaggrine subit une déamination qui aura comme effet un changement de la charge de la filaggrine qui va passer de basique à neutre. Cette déamination est catalysée par des peptidylarginine déaminases (Tarcsa et al., 1996). Ceci permet de couper les liens ioniques qui existaient entre la filaggrine et les filaments de kératines, générant ainsi la dégradation de la filaggrine en acides aminés. La présence de ces acides aminés permet la rétention d'eau et l'hydratation de la peau au sein de la couche cornée (Sandilands et al., 2009) (figure 7).

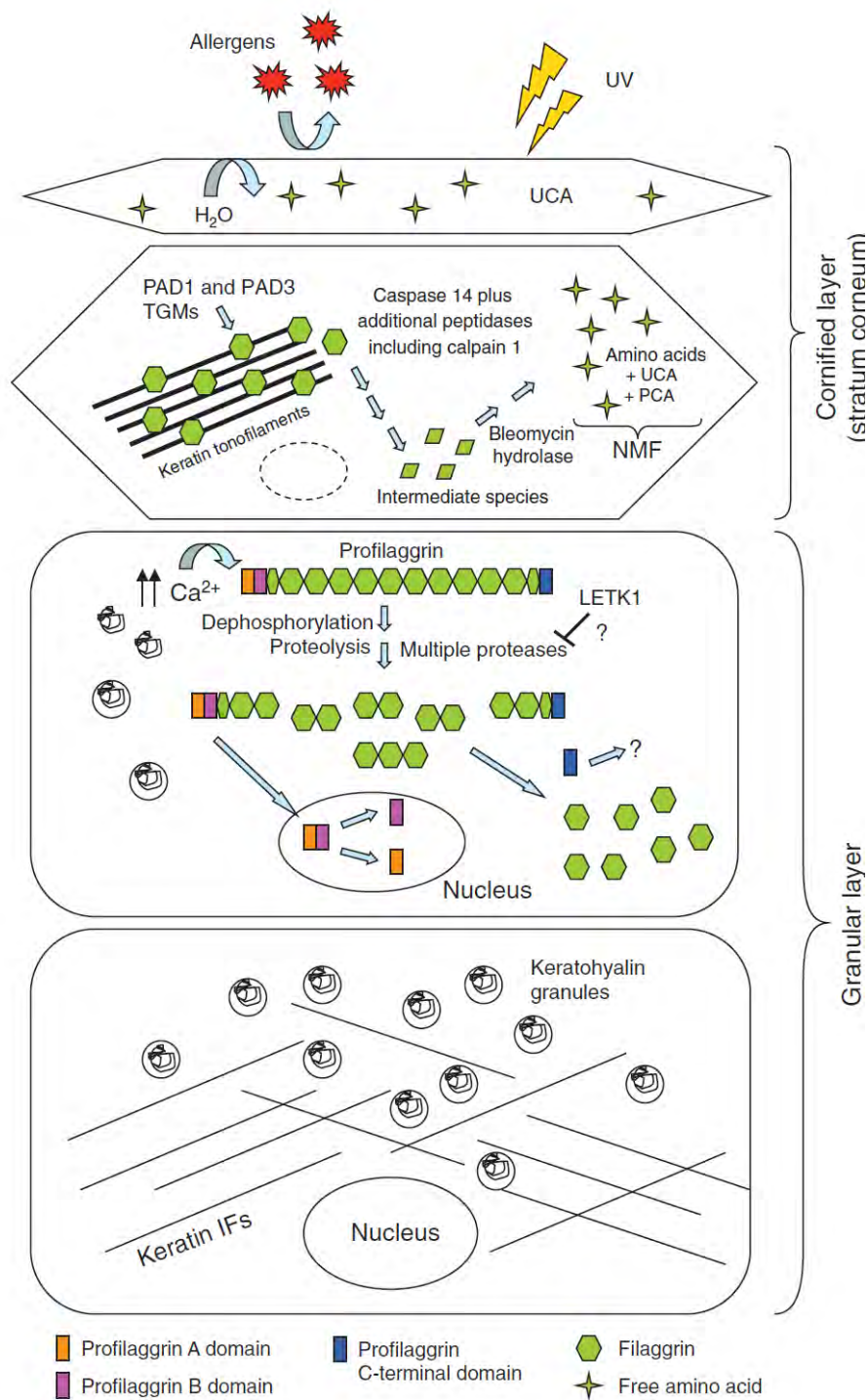


Figure 7 : Représentation des différentes étapes de la formation de la filaggrine, ainsi que de sa fonction. La profilaggrine est stockée dans les granules de kératohyalines et en réponse à une augmentation de la concentration de Ca^{++} , la profilaggrine est déphosphorylée et clivée en monomère de filaggrine. Une fois libérés, les monomères de filaggrine vont se lier aux filaments de kératines permettant ainsi leur agrégation. Par après, la filaggrine subira une dégradation par plusieurs protéases libérant ainsi des acides aminés qui permettront l'hydratation de la peau (Sandilands et al., 2009).

La loricrine est exprimée dans la couche granuleuse est le principal composant de la couche cornée puisqu'elle constitue entre 70 et 85 % de la masse totale de cette couche. La fonction principale de la loricrine semble être le renforcement de la couche cornée au niveau de son cytoplasme par l'intermédiaire de liaisons loricrine – loricrine (Steinert and Marekov, 1995). Des liaisons loricrine – kératine et loricrine – filaggrine sont également présentes, laissant suggérer qu'une partie des complexes constitués de protéines et de filaments intermédiaires de kératine sont attachés à l'enveloppe cornée (Hohl et al., 1991).

L'involucrine est un composé très important de la couche cornée puisqu'elle s'associe à une variété d'autres protéines structurales de la couche cornée. Cela confirme l'idée reçue que l'involucrine est un composé précoce de la formation de cette enveloppe et qu'elle fournit une structure sur laquelle les autres protéines peuvent par après s'assembler (Candi et al., 2005).

Les transglutaminases font parties d'une famille d'enzymes dont le rôle est primordial pour la formation de l'enveloppe cornée. Les transglutaminases sont responsables de la formation de ponts isopeptides très stables qui induisent les caractéristiques de résistance et d'insolubilité à la couche cornée (Candi et al., 2005). Elles sont entre autres impliquées dans la synthèse de la loricrine et de l'involucrine, mais également dans la formation des filaments intermédiaires de kératines. En absence de transglutaminase, le réseau filaggrine — filament intermédiaire de kératines ne peut pas se former.

1.5 Les kératines

Les kératines sont le constituant principal des microfilaments intermédiaires présent dans le cytoplasme des cellules épithéliales. Actuellement, la famille des kératines se compose de 54 gènes possédant chacun une fonction distincte dont 28 sont des kératines épithéliales (Coulombe and Omary, 2002). La formation des filaments intermédiaires de kératine fait intervenir deux types de kératines, les kératines de type I et les kératines de type II qui vont s'assembler en paires. Les kératines de type I qui comprennent les kératines K9 - K20, K23 et K24 sont acides (pI inférieur à 5,5) et les kératines de types II incluant les kératines K1 – K8 et K76 – K80 sont basiques ou neutres (pI supérieur à 6) (Coulombe and Omary, 2002; Moll et al., 2008). Au cours de la différenciation des kératinocytes, chaque couche cellulaire exprime une association de kératines qui lui est propre.

Les kératines exprimées au niveau de la couche basale et des cellules souches sont les kératines K5 et K14. Ces kératines forment des filaments qui s'attachent aux desmosomes et hémidesmosomes afin de permettre la stabilité physique de l'épiderme ainsi que ses propriétés d'imperméabilité (Moll et al., 2008). En plus de ces deux kératines, on retrouve également la kératine K15 qui est spécifique aux cellules basales de l'épiderme et des autres épidermes stratifiés (Waseem et al., 1999). Lorsque la cellule quitte la couche basale,

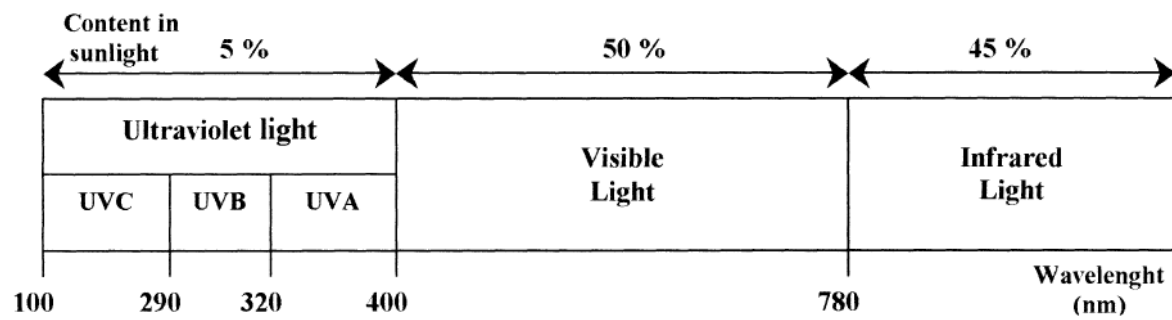


Figure 8 : Représentation du spectre électromagnétique des radiations solaires (Svobodova et al., 2006).

K5 et K14 restent encore intégrées au cytosquelette de la cellule sur une petite période, à l'opposé de K15 qui n'est restreint qu'à la couche basale (Waseem et al., 1999).

Le couple K6 – K16 est un marqueur de kératinocytes hyperprolifératifs et est induit dans les 6 heures après une blessure, et ce, avant que la migration et la différenciation ne commencent (Paladini et al., 1996). La kératine 17 est également activée après une blessure, et ce, après l'activation de K6 et K16. Cette kératine n'est pas normalement présente chez l'adulte, mais est un constituant prédominant de l'épiderme fœtal (Mazzalupo et al., 2003). K17 peut également se fixer à une protéine adaptatrice qui est 14-3-3 σ afin d'influencer la croissance cellulaire et la taille des kératinocytes de souris en régulant la synthèse de protéines (Moll et al., 2008). Ces trois kératines sont inductibles en cas de stress, blessure ou inflammation et sont également exprimées dans les cas de carcinomes spinocellulaires (Moll et al., 2008).

Une fois que les kératinocytes atteignent la couche épineuse, ils subissent un changement dans l'expression de leurs kératines. Les kératines K5 et K14 sont remplacées par les kératines K1 et K10 (Kanitakis, 2002). Ces kératines s'assemblent afin de former des filaments denses qui vont fournir l'intégrité mécanique à l'épiderme. À côté de cela, les K10 ont un rôle dans l'inhibition de la prolifération ainsi que dans l'arrêt du cycle cellulaire des kératinocytes et leur perte induit une augmentation du renouvellement des kératinocytes (Reichelt et al., 2004). La kératine K9 quant à elle, est spécifique aux kératinocytes de la paume des mains et à la plante des pieds où elle est exprimée en grande quantité alors que son expression est plus limitée aux autres zones du corps (Moll et al., 2008). L'association de K9 avec K1 est le résultat d'un programme de différenciation spécifique qui résulte en un mécanisme de renforcement particulier (Swensson et al., 1998).

1.6 Les UV et leurs conséquences

1.6.1 Le rayonnement solaire

Le soleil émet une énergie sous forme d'un rayonnement électromagnétique. Ce rayonnement électromagnétique peut être décomposé en différentes catégories. Ainsi, le spectre solaire se compose de 50 % de lumière visible (400-800 nm) qui est essentielle à la photosynthèse et qui nous fournit la luminosité, de 45 % d'infrarouges (>800 nm) qui sont responsables de l'apport de chaleur et de 5 % de rayons UV (190-400 nm) (Svobodova et al., 2006) (figure 8).

Parmi ces différents rayonnements, les UV sont les plus énergétiques et sont responsables de la plupart des effets liés à une exposition aigüe au soleil (erythème ou coup de soleil, photovieillissement et cancer). Les UV ont été divisés en trois classes selon leur longueur d'onde (Lippens et al., 2009) :

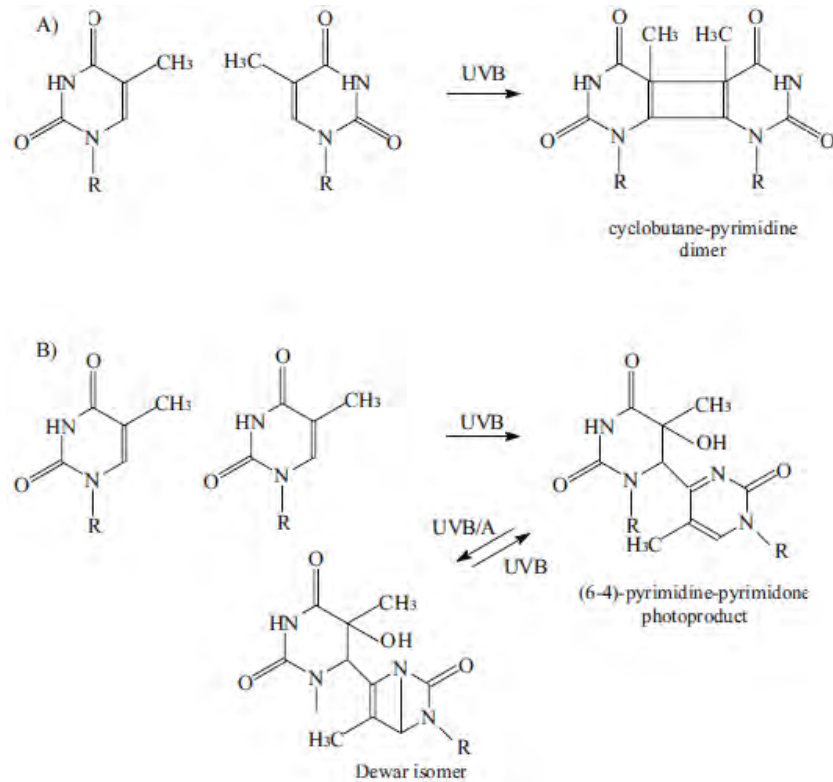


Figure 9 : Formation de dimères pyrimidiques suite à l'association de deux bases pyrimidiques située sur un même brin d'ADN exposé aux UV (Svobodova et al., 2006).

- A : formation de dimères pyrimidines-cyclobutanes (CPDs).
- B : formation de pyrimidines (6-4) pyrimidone (6-4 PPs).

- UVA 320-400 nm
- UVB 290-320 nm
- UVC 190-290 nm

L'énergie des rayonnements étant inversement proportionnelle à leur longueur d'onde, les UVA sont les moins énergétiques alors que les UVC sont les plus énergétiques et par conséquent, les plus nocifs via leur pouvoir mutagène important (Lippens et al., 2009). Toutefois, lorsque le spectre solaire atteint la terre, la couche d'ozone absorbe tous les UV possédant une longueur d'onde inférieure à 310 nm. Grâce à cela, seuls les UVA (90-99 %) et une partie des UVB (1-10 %) traversent la couche d'ozone, limitant ainsi l'agressivité des UV sur notre organisme (Verschooten et al., 2006). Au niveau de la pénétration de ces rayons dans la peau, les UVB pénètrent dans l'épiderme et atteignent la partie supérieure du derme alors que les UVA peuvent atteindre les couches inférieures du derme (Svobodova et al., 2006).

En photobiologie, le Joule est l'unité énergétique la plus fréquemment utilisée pour exprimer la quantité d'énergie lumineuse ou la quantité d'énergie présente dans un rayonnement (Hussein, 2005). Le Joule est la quantité d'énergie nécessaire pour augmenter d'un degré Celsius un gramme d'eau. Lorsqu'une énergie lumineuse est appliquée sur la peau, on parlera de dose qui sera exprimée en Joule par cm². Par contre, le taux de radiation ultraviolet qui est fourni est nommé intensité et se quantifie en W/cm². De plus, la dose et l'intensité peuvent être reliées selon l'équation suivante :

Dose (J/cm²) = Intensité (W/cm²) x Temps d'exposition (Hussein, 2005).

1.6.2 Dommages induits par les UV

1.6.2.1 Dommages directs à l'ADN

Le spectre d'absorption de l'ADN couvre à la fois les UVB et les UVC, mais les UVC étant retenus par la couche d'ozone, les UVB sont les seuls rayons capables de provoquer des dommages directs à l'ADN (Greenlee et al., 2001) (Ichihashi et al., 2003). Les dommages les plus fréquents induits par les UVB sont la formation de liens covalents entre deux bases pyrimidiques situées l'une à côté de l'autre sur le même brin d'ADN, formant un dimère de pyrimidines. Suivant la nature du lien, on distingue les dimères pyrimidines-cyclobutanes (CPDs) (70-80 % des mutations) ou les pyrimidines (6-4) pyrimidone (6-4 PPs) (20-30 % des mutations) (figure 9) (Matsunaga et al., 1991). La réplication de ces dommages s'ils ne sont pas réparés, induira une augmentation des mutations sur l'ADN, ce qui peut à moyen ou long terme mener au développement de cancers cutanés. Il a été calculé que le nombre de CPDs formés dans une cellule basale épidermique suite à une exposition de 60 minutes en été et sur le temps de midi (Kobe, Japon) était approximativement de 100 000 par cellule (Ichihashi et al., 1998). Les pyrimidines (6-4) pyrimidone semblent être moins mutagènes que les CPDs puisque leur réparation est plus efficace. Nakagawa et son équipe ont montré que 90 % des

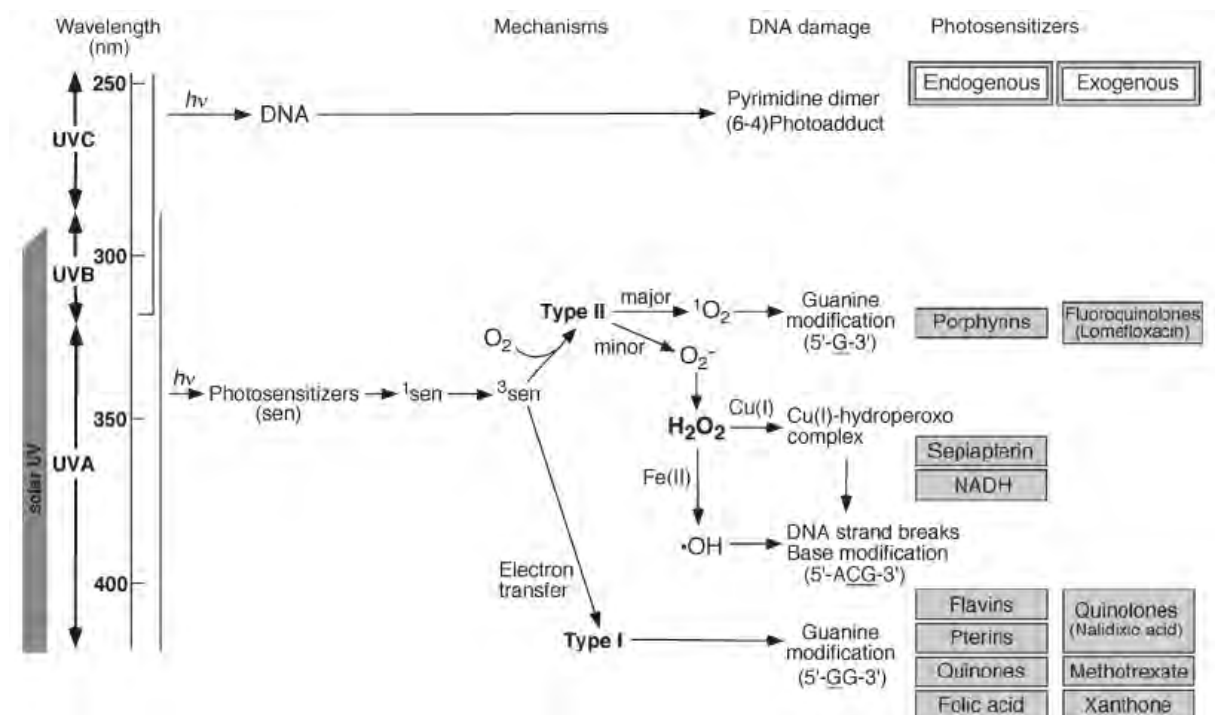


Figure 10 : Représentation des dommages induits dans la cellule en fonction du type d'UV (Hiraku et al., 2007).

pyrimidines (6-4) pyrimidone sont réparés 3 heures après l'irradiation (Nakagawa et al., 1998).

Les mutations dérivées des UVB ont une signature bien particulière sur l'ADN, qui est une transition sur les sites pyrimidiques TC → TT et CC → TT sur les sites dipyrimidiques. Les mutations sur le gène p53 semblent avoir une incidence importante des cancers cutanés induits par les UVB (Ziegler et al., 1994).

1.6.2.2 Réaction de photosensibilisation

Les UV émettent une énergie sous forme de photons qui peuvent être absorbés par des molécules photosensibles. On peut distinguer deux grands types de mécanismes. Le mécanisme de type I qui interagit directement avec sa cible via un transfert d'électron et le mécanisme de type II qui génère des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) suite à un transfert d'énergie à l'oxygène (Ichihashi et al., 2003) (figure 10).

Le mécanisme de type I implique une réaction directe via un transfert d'électron entre une molécule photosensible excitée et l'ADN. Cette réaction est indépendante de l'oxygène, mais fait intervenir le potentiel d'oxydation de l'ADN (la guanine qui possède le potentiel d'oxydation le plus faible sera préférentiellement oxydée) et celui de réduction de la molécule photosensible excitée (Hiraku et al., 2007). En plus d'induire des mutations sur la guanine, le mécanisme de type I induit principalement la formation de 8-hydroxydeoxyguanine parmi d'autres lésions possibles (Svobodova et al., 2006).

Le mécanisme de type II implique un transfert d'énergie entre une molécule photosensible excitée et l'oxygène, ce qui va générer l'apparition des différents radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS), molécules hautement réactives qui interagissent avec les différents constituants cellulaires avec comme cible privilégiée l'ADN. Parmi les ROS, sont repris les espèces radicalaires ou non qui dérivent de l'oxygène : le radical hydroxyle (OH[•]), l'anion superoxyde (O₂^{•-}) qui est produit en plus petite quantité suite à la dismutation du peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet (O₂¹) qui est un oxydant très puissant possédant un temps de demi-vie assez long et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui n'est pas capable de produire des dommages seuls. Pour y arriver, la présence d'un métal cationique (fer ou cuivre) est nécessaire afin de générer des radicaux hydroxyles par une réaction de Fenton (Svobodova et al., 2006). Les ROS pourront ensuite interagir avec les différents constituants cellulaires et y provoquer des lésions. Les macromolécules comme les lipides, acides nucléiques ou protéines sont les cibles préférentielles des ROS (Bickers and Athar, 2006) .

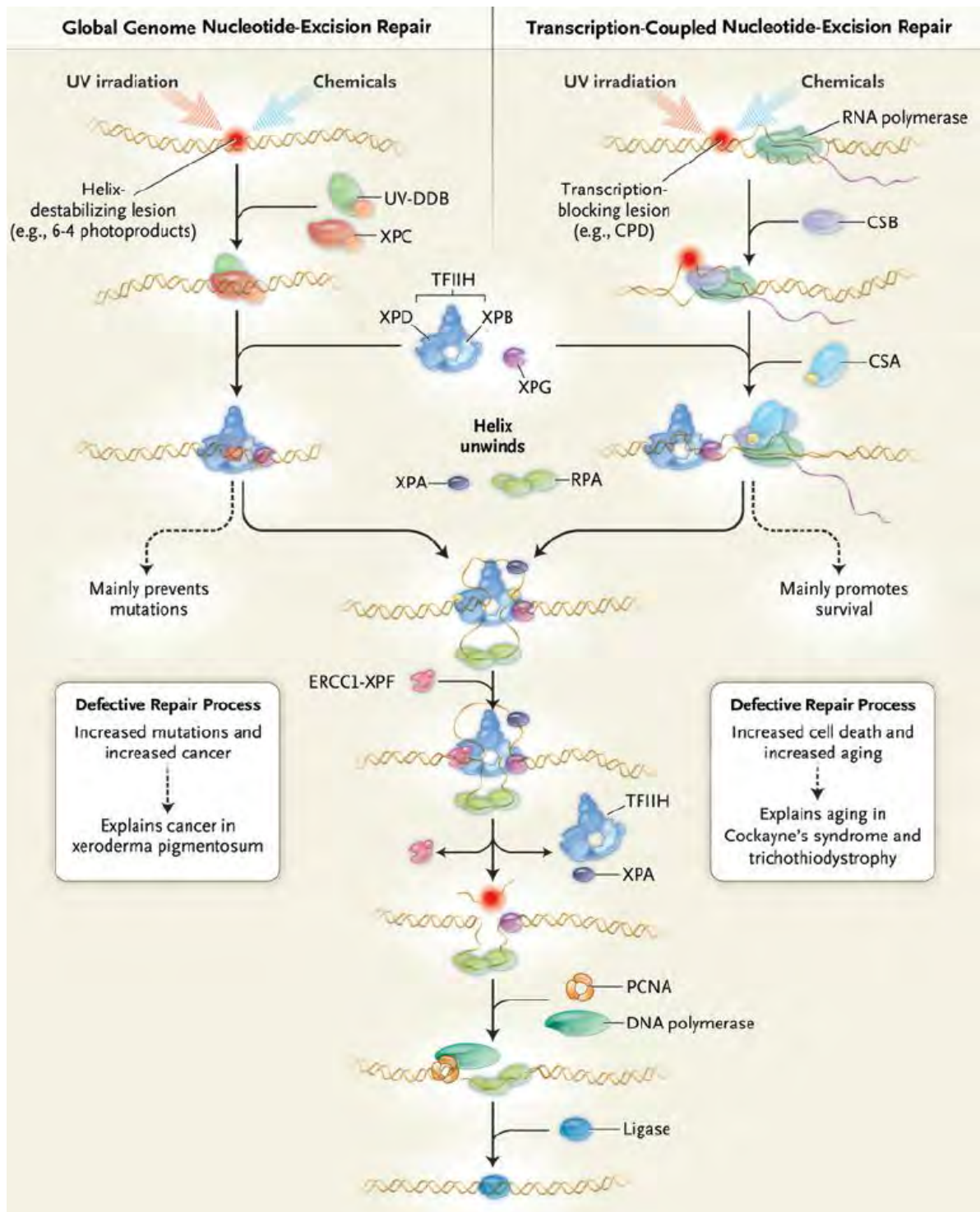


Figure 11 : Représentation du mécanisme de réparation des dommages à l'ADN NER (Nucleotide Excision Repair) avec ses deux voies : GGR (Global Genome Repair) et TCR (Transcription Coupled Repair). La première opération est la reconnaissance du dommage à l'ADN avant l'ouverture du brin. L'ADN endommagé sera ensuite excisé, suivi de la synthèse d'un nouveau brin et de sa ligation (Hoeijmakers, 2009).

1.6.3 Systèmes de défense

1.6.3.1 Réparation de l'ADN

L'ADN est la seule molécule biologique présente en une seule copie au sein de la cellule et son intégrité repose sur des mécanismes de réparation très compétents. En effet, les dommages à l'ADN non réparés peuvent mener à la formation de cancers ainsi qu'au vieillissement de l'organisme. Il existe trois sources qui sont responsables des dommages. Premièrement, des réactions spontanées résultant de la nature chimique de l'ADN peuvent créer des déaminations (Lindahl, 1993). Deuxièmement, les ROS peuvent également induire des dommages à l'ADN. Finalement, l'ADN peut être endommagé par des agents exogènes chimiques et physiques (UV, radiations γ , etc). Pour une revue : (Hoeijmakers, 2009).

Afin de conserver l'intégrité de l'ADN, la cellule possède une large gamme de systèmes de réparation qui sont spécifiques à un type de dommage bien précis. On y retrouvera les recombinaisons homologues et non homologues qui peuvent réparer les lésions provenant de cassures double brin, mais également le système de Nucléotide Excision Repair (NER) qui peut supprimer les dommages importants induisant une distorsion de l'ADN ou empêchant la transcription et qui sont typiques des UV (Sancar, 1995).

Le système NER peut être divisé en deux voies distinctes (figure 11) en fonction de la reconnaissance des lésions. Le Global Genome Repair (GGR) intervient lors de réparation impliquant une distorsion de l'ADN peu importe sa localisation dans le génome et est initialisé par des protéines de reconnaissance des lésions telles que XPC (Mitchell et al., 2003). Le Transcription Coupled Repair (TCR) est quant à lui actif sur les lésions induisant un blocage de l'ARN polymérase II sur le brin en cours de transcription (Hoogstraten et al., 2008) et reconnaît les lésions grâce aux protéines CSA et CSB. À partir du moment où la lésion est reconnue, que ce soit, l'une ou l'autre voie, le système NER fonctionne toujours de façon identique : ouverture de l'ADN et vérification de la lésion ; excision d'un brin d'une taille de 25 à 30 nucléotides contenant l'ADN endommagé ; synthèse d'un nouveau segment d'ADN et ligation, le tout faisant intervenir une trentaine de protéines différentes.

1.6.3.2 Protection contre les stress oxydatifs

Pour se protéger des dommages oxydatifs, plusieurs mécanismes antioxydants existent au sein de la cellule afin de la protéger :

- Conversion de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène via la superoxyde dismutase.
- Conversion du peroxyde d'hydrogène en eau via la catalase.
- Réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes avec une régénération du glutathion via les glutathion réductases et peroxydases (Bickers and Athar, 2006).

1.6.4 Les cancers cutanés

Les dommages générés par les UV, peuvent s'ils ne sont pas correctement réparés, induire des mutations pouvant mener à des cancers cutanés (Ichihashi et al., 2003). Il y a actuellement, un cancer sur trois qui est un cancer de la peau avec plus d'un million de cancers cutanés déclarés chaque année aux États-Unis (avec une proportion de 80 % de carcinomes basocellulaire (BCC), 16 % de carcinomes épidermoïdes (SCC) et de 4 % de mélanomes) (Bikle, 2008). Cette augmentation des cancers cutanés peut s'expliquer par différents facteurs parmi lesquels on retrouve le changement dans les habitudes de vie où le bronzage prend de plus en plus d'importance et la destruction de la couche d'ozone qui laisse dès lors passer plus de rayons UV.

Les cancers cutanés peuvent être divisés en deux catégories : les mélanomes d'un côté et les cancers de la peau ne dérivant pas de mélanomes (Non Melanoma Skin Cancer ou NMSC) de l'autre. Parmi ces NMSC, on retrouve principalement des carcinomes basocellulaires (Basal Cell Carcinomas ou BCC) ainsi que des carcinomes épidermoïdes (Squamous Cell Carcinomas ou SCC), provenant de dérèglements au niveau des kératinocytes. Des mutations induites dans le gène p53 sont régulièrement retrouvées comme facteur déclencheur de cancers BCC et SCC (Lacour, 2002). Pour lutter contre les cancers, l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose sont les principaux mécanismes de défense que possède la peau (Fesik, 2005).

1.6.4.1 Les mélanomes

En raison de leur propriété invasive plus importante que les autres cancers, les mélanomes représentent une menace sanitaire très importante. À un stade précoce, les mélanomes peuvent être soignés par chirurgie, mais une fois que le stade métastatique a été atteint, il est extrêmement difficile de le traiter. Suite à une mutation, les mélanocytes peuvent échapper à la régulation induite par les kératinocytes (Gray-Schopfer et al., 2007), proliférer et former des naevi qui sont bénins. Il existe deux phases différentes de croissance chez les naevi qui sont la phase de croissance radiale (RGP pour radial growth phase) qui constitue une lésion intraépidermique et la phase de croissance verticale (VGP pour vertical growth phase). Les naevi de la VGP proviennent de naevi de la RGP qui ont progressé vers un stade beaucoup plus dangereux dans lequel les cellules ont développé un potentiel métastatique avec la possibilité d'envahir le derme. Le développement d'un mélanome n'est pas ordonné, les mélanocytes peuvent directement entrer dans l'une des deux phases voir directement former un mélanome malin métastatique (Miller and Mihm, 2006).

Les mélanomes peuvent être divisés en quatre sous catégories. Le lentigo maligna qui se développe avec l'âge et que l'on retrouve dans les régions du corps exposées au soleil. Ces mélanomes ont une forme aplatie et sont associés aux expositions fréquentes au soleil. Les mélanomes nodulaires, constitués de nodules sans aspect aplati. Les régions de la paume et de la plante développent plus facilement des ALM (acral lentiginous melanoma) qui sont un type de mélanome indépendant des UV. La quatrième catégorie, qui est la plus commune est le

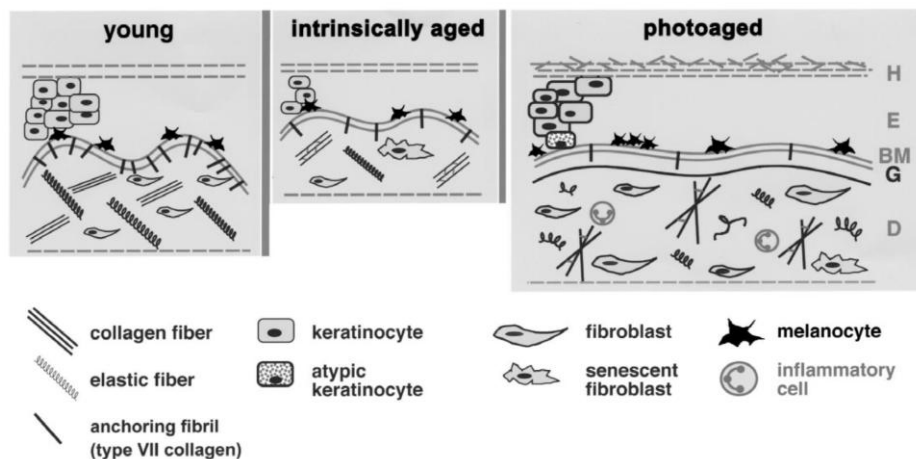


Figure 12 : Représentation des caractéristiques d'une peau jeune, âgée et photoâgée. La peau jeune possède une quantité équitable des différents éléments la composant. La peau âgée (vieillissement intrinsèque) présente une diminution d'épaisseur du derme et de l'épiderme accompagné d'une réduction des composants de la matrice extracellulaire à morphologie sénescence des fibroblastes. La peau photoâgée (vieillissement extrinsèque) présente un épaissement du derme et de l'épiderme ainsi qu'une distribution hétérogène des mélanocytes (Wlaschek et al., 2001).

mélanome superficiel (SSM pour superficial spreading melanoma). Il est de forme aplatie et provient de coups de soleil importants (Gray-Schopfer et al., 2007).

1.6.4.2 Les carcinomes

Les carcinomes représentent la grande majorité des cancers. Ces cancers ont un meilleur pronostic de guérison, mais présentent un risque de récurrence très important. Il y a approximativement 200 000 nouveaux cas de SCC diagnostiqués chaque année aux États-Unis avec moins de 1 % de morts. Les tumeurs SCC dérivent de kératinocytes déjà différenciés. Les BCC quant à eux, seraient le résultat de la transformation d'une cellule basale épidermique, d'un follicule pileux ou d'une glande sébacée (Hussein, 2005). La différence qui existe entre les BCC et SCC est leur développement. Les BCC se développent spontanément alors que les SCC proviendraient d'un processus plus complexe faisant intervenir plusieurs étapes. La cause principale du développement de ces cancers est une exposition répétée aux UV. L'un des événements précurseurs du développement de ces cancers est la mutation du gène p53 qui fait de lui un bon marqueur de risque pour le développement de cancers (Boukamp, 2005). Il a été avancé que plus de 90 % des SCC et plus de 50 % des BCC ont un gène p53 muté (Brash et al., 1996). Les BCC se situent en grande majorité au niveau de la tête et du cou bien que l'on peut en trouver sur d'autres régions du corps. Leur phénotype est assez varié, allant d'une petite tache rouge ou blanche à un bouton en relief de couleur rougeâtre. Les SCC quant à eux se situent principalement sur les régions exposées au soleil que ce soit la tête, les avant-bras ou autres. Leur aspect est une sorte de croûte blanchâtre qui s'épaissit progressivement jusqu'à former une plaie irrégulière.

1.7 Le photovieillissement

La peau comme tout autre organe subit un vieillissement progressif au cours des années (vieillissement intrinsèque), mais en plus de cela, la peau est exposée aux agressions extérieures comme les UV, ce qui à long terme sera responsable du photovieillissement (vieillissement extrinsèque), principalement suite à la génération de dommages dans le derme (Wlaschek et al., 2001). Ces deux types de vieillissement causent principalement une réorganisation des fibres de la matrice extracellulaire du derme.

En comparaison avec une peau jeune, une peau photoâgée est caractérisée par un épaissement du derme et de l'hypoderme (figure 12). De plus, les éléments constituant le derme sont désorganisés, impliquant une perte de fonction. Les fibroblastes du derme présentent une morphologie sénescence. Les mélanocytes quant à eux sont distribués de manière hétérogène, induisant la formation de « tache de vieillesse » (Wlaschek et al., 2001).

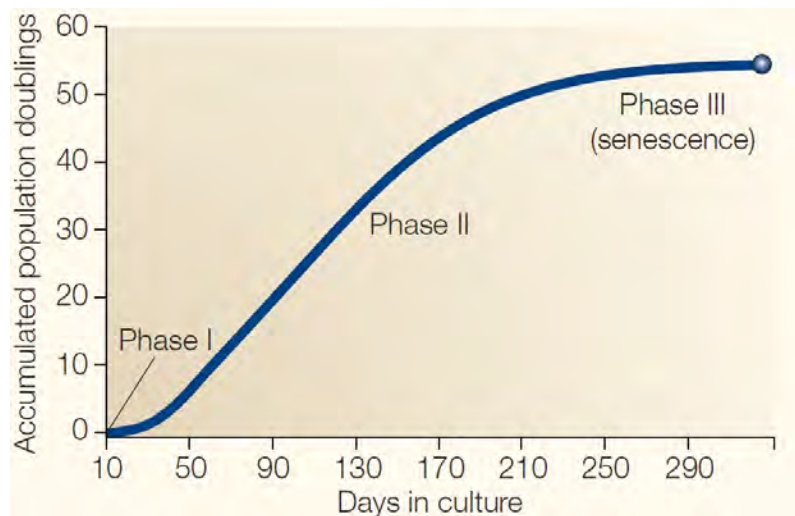


Figure 13 : Représentation des trois phases de Hayflick. La phase I correspond à la mise en culture des cellules ; la phase II est la période de répllication exponentielle de la culture et la phase III représente le moment où les cellules arrêtent de se diviser tout en conservant un métabolisme actif (sénescence) (Shay and Wright, 2000).

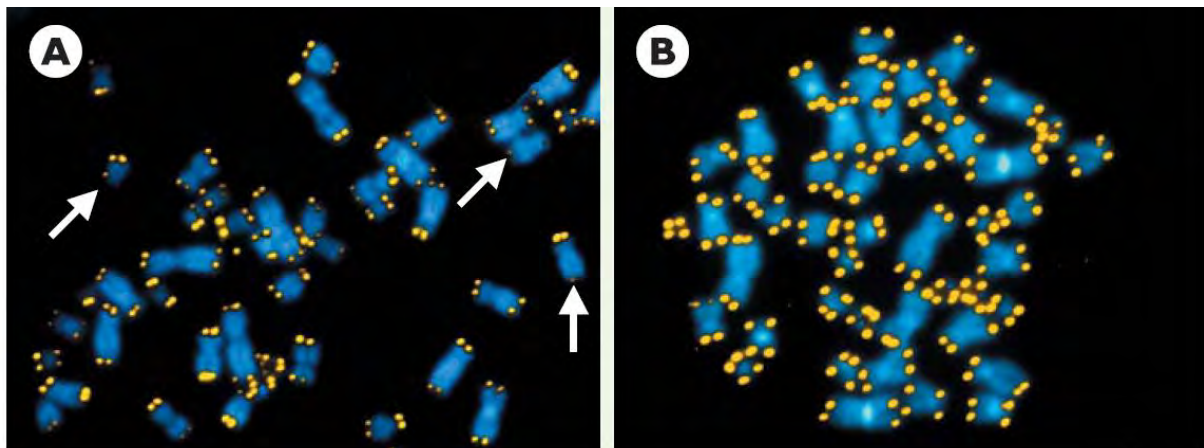


Figure 14 : Mise en évidence de la longueur des télomères de lymphocyte T en utilisant la technique QFISH. En A, les télomères sont courts et proviennent de lymphocytes T pré-sénescents. En B, les cellules expriment la sous-unité hTERT, leur permettant de conserver des télomères de taille importante (Rufer and Nabholz, 2003).

1.8 La sénescence

En 1961, Léonard Hayflick a mis en évidence qu'une culture de cellules humaines possédait une capacité limitée à se diviser, après quoi, les cellules deviennent sénescents. Ce phénomène est depuis connu sous le nom de limite de Hayflick ou sénescence répliquative (Hayflick and Moorhead, 1961). Il démontra que la culture de fibroblastes humains pouvait se répartir en trois phases (figure 13). La phase I correspondant à la mise en culture des cellules, la phase II est la période durant laquelle les cellules se répliquent continuellement et la phase III constitue la phase à laquelle les cellules arrêtent de se diviser tout en restant métaboliquement active (sénescence) (Hayflick and Moorhead, 1961). Ce phénomène marque l'une des grandes différences qu'il existe entre une cellule humaine saine et une cellule cancéreuse qui peut se répliquer indéfiniment. Il a été mis en évidence par après que le mécanisme responsable de cette sénescence répliquative était le raccourcissement des télomères et que l'arrêt du cycle cellulaire se produisait principalement en phase G1/S. Une fois entrées dans un état sénescence, les cellules conservent un métabolisme actif et peuvent rester viables pendant quelques mois (Jeyapalan and Sedivy, 2008).

1.9 Les marqueurs de la sénescence

La majorité des cellules sénescents possèdent une série de caractéristiques qui permettent de les différencier des cellules prolifératives. Parmi ces caractéristiques, on retrouve le raccourcissement des télomères, l'arrêt du cycle cellulaire, une morphologie étalée, un changement d'expression génique et protéique, une surexpression d'inhibiteurs de kinase dépendantes de cyclines et une activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (Blackburn, 2005; Dimri et al., 1995; Jeyapalan and Sedivy, 2008). *In vivo*, on observe une augmentation de l'expression de p16^{INK4a} dans l'épiderme de donneur âgés (Sandhu et al., 2000) ainsi qu'une augmentation de l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (Dimri et al., 1995).

1.9.1 Le raccourcissement des télomères

Les télomères sont situés aux extrémités des chromosomes (figure 14). L'ADN télomérique est constitué entre 5 000 et 12 000 répétitions en tandem de la séquence 5' – TTAGGG – 3'. La présence de ces répétitions fournit un grand nombre de sites de liaison pour les protéines télomériques organisées en une structure appelée « télosome ». La fonction de ce télosome est de protéger le génome contre tout événement qui pourrait y induire une instabilité. Parmi ces événements, on peut citer la fusion entre deux télomères ou d'un télomère avec une extrémité cassée d'ADN, la dégradation de l'extrémité d'un chromosome ou des recombinaisons inappropriées. Tous ces événements pourraient avoir des conséquences importantes sur l'intégrité du génome (Blasco, 2005).

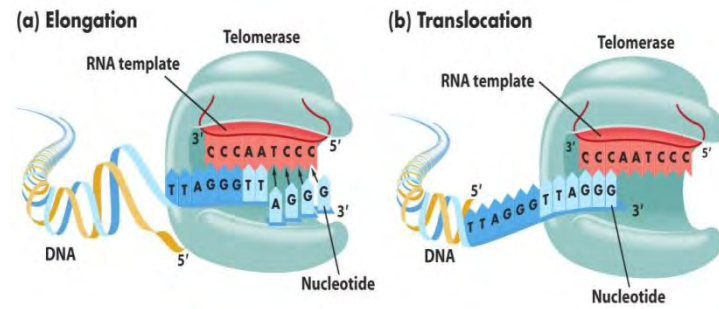


Figure 15 : Représentation d'une télomérase en action, avec sa partie catalytique (hTERT) et sa partie comprenant un ARN complémentaire à la séquence télomérique.

http://barleyworld.org/css430_09/lecture%207-09/figure-07-25.JPG

Lors de chaque division cellulaire, la taille des télomères subit un raccourcissement qui va de 50 à 200 nucléotides (Rufer and Nabholz, 2003). Ce phénomène provient du fait que lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase est incapable de répliquer entièrement les extrémités des chromosomes. Ceci est dû au fait que l'ADN est répliqué dans le sens 5' vers 3' à partir d'une amorce d'ARN. Il y a donc formation d'une fourche de réplication à partir de laquelle un brin continu et un brin discontinu sont synthétisés. Les brins discontinus également appelés fragments d'Okazaki sont à chaque fois initiés par une amorce d'ARN qui sera remplacée par de l'ADN à l'exception de la première amorce qui est localisée à l'extrémité du chromosome. De ce fait, à chaque division de la cellule, les extrémités du chromosome se raccourcissent. Lorsque la taille des télomères atteint une longueur critique, ils semblent être reconnus comme dommages à l'ADN, induisant l'arrêt du cycle cellulaire et donc une sénescence répllicative (de Lange, 2002).

La longueur des télomères peut être maintenue constante via la télomérase qui est une ribonucléoprotéine transcriptase inverse capable d'ajouter des séquences télomériques aux extrémités 3' (Blackburn, 2005) (figure 15). Cette enzyme se compose de deux unités essentielles à son fonctionnement. La première est la sous-unité catalytique TERT (telomerase reverse transcriptase), également appelée hTERT chez l'homme. La seconde est un ARN possédant une séquence complémentaire à la séquence 5' – TTAGGG – 3' et qui agit comme matrice lors de la synthèse des nouvelles séquences télomériques. Ce composant est nommé TERC (telomerase RNA component) (Blackburn, 2005). La matrice d'ARN est constitutivement exprimée dans la plupart des cellules somatiques humaines alors que la sous-unité catalytique ne l'est pas, on ne la retrouve exprimée que dans les cellules germinales ou les cellules cancéreuses. De ce fait, l'activité de la télomérase dépend de la présence ou de l'absence de hTERT (Rufer and Nabholz, 2003). Le maintien de la longueur des télomères par la télomérase est essentiel à l'immortalisation et au développement de tumeurs (Shay and Wright, 2006).

L'introduction du gène hTERT dans des cellules présénescents permet de maintenir la taille de leurs télomères et par la même occasion de fournir un potentiel de réplication illimité à ces cellules (Bodnar et al., 1998). Mais, ceci n'est pas applicable à tous les types cellulaires et notamment aux kératinocytes pour lesquels, l'expression de hTERT n'est pas suffisante pour induire l'immortalisation (Dickson et al., 2000).

1.9.2 L'arrêt du cycle cellulaire

1.9.2.1 p16^{INK4a}

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases distinctes que sont la phase G1, S, G2 et M. De plus, ce cycle est régulé par la synthèse et la destruction de cyclines qui s'associent à des kinases cycline-dépendantes (CDK). En effet, la transition d'une phase du cycle cellulaire vers la suivante nécessite l'activation et l'inactivation chronologique d'une famille de CDK

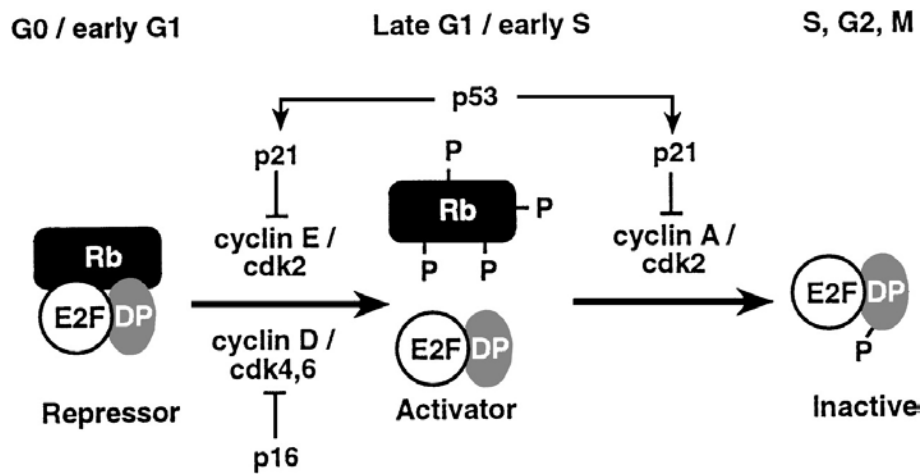


Figure 16 : Représentation de la régulation du cycle cellulaire par $p21^{\text{WAF-1}}$, $p16^{\text{INK4a}}$ et $p53$ qui vont agir sur les couples cyclines/CDK et permettre ou non à la cellule d'entrer dans la phase suivante du cycle (Johnson and Walker, 1999).

(CDK 1 à 7). La protéine p16^{INK4a}, ainsi que p21^{WAF-1} sont des inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (CDKI) possédant une fonction importante dans la régulation du cycle cellulaire puisqu'elles peuvent arrêter le cycle à certains points de contrôles, les « checkpoints » (Pavey et al., 2001).

Le complexe cycline D – CDK 4 ou CDK 6 qui phosphoryle la protéine de rétinoblastome (pRb) est inhibé par de petits peptides dérivés de p16^{INK4a}. Ces peptides de 20 acides aminés peuvent se lier à CDK 4 ou CDK 6, inhiber l'activation du complexe cycline D – CDK 4/CDK 6 en prenant la place de la cycline D sur le site actif et bloquer la progression du cycle cellulaire en phase G1/S (figure 16). pRb joue un rôle très important dans la régulation de la progression de la phase G1 et est une cible privilégiée des mécanismes régulant le cycle cellulaire (Johnson and Walker, 1999).

Le gène de p16^{INK4a} se trouve sur le chromosome 9p et plus précisément sur le locus INK4a/ARF qui code pour trois protéines : p12, p14^{ARF} et p16^{INK4a} (Chaturvedi et al., 2003). En fonction du stimulus reçu par la cellule, un épissage alternatif de l'ARN messenger permettra la synthèse d'une des trois protéines. p16^{INK4a} est surexprimé chez des kératinocytes atteignant un état de confluence, leur conférant les caractéristiques d'une sénescence prématurée (Chaturvedi et al., 1999). À côté de sa fonction dans la sénescence prématurée, on observe une augmentation de l'expression de p16^{INK4a} et de son association avec CDK 4 et CDK 6 avec l'âge. Cette augmentation a été détectée dans une grande variété de tissus et provient principalement d'une augmentation transcriptionnelle (Jeyapalan and Sedivy, 2008).

1.9.2.2 p21^{WAF-1}/p53

Parmi les autres protéines régulant le cycle cellulaire, le couple p21^{WAF-1}/p53 joue un rôle important. En effet, p21^{WAF-1} est une CDKI dont l'expression est induite par le facteur de transcription p53. En plus de son rôle d'inhibiteur du cycle cellulaire, p21^{WAF-1} peut interagir avec PCNA qui intervient dans la réparation de l'ADN ainsi que dans son élongation (Li et al., 1994). En cas de dommage à l'ADN, p53 active l'expression de p21^{WAF-1} en se liant à son promoteur. Une fois transcrit, p21^{WAF-1} peut inhiber le cycle cellulaire de deux façons différentes. Soit en agissant sur des complexes cycline/CDK, soit en interagissant avec PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) afin d'empêcher la synthèse de l'ADN (Johnson and Walker, 1999). p21^{WAF-1} est donc un facteur important de la réponse p53 en cas de dommage à l'ADN puisqu'il peut arrêter le cycle cellulaire sans interférer avec la réparation de l'ADN. À côté de cela, il a été observé une accumulation de p21^{WAF-1} dans les cellules sénescents, laissant suggérer une implication dans le phénomène du vieillissement (Noda et al., 1994).

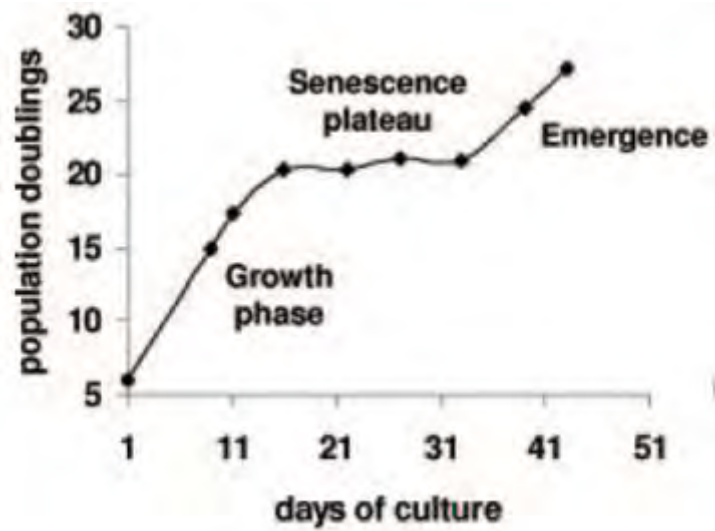


Figure 17 : Courbe de croissance des kératinocytes avec la phase de croissance, le plateau de sénescence et la phase d'émergence.

1.9.2.3 p27^{KIP}

p27^{KIP} est une autre protéine intervenant dans la régulation du cycle cellulaire, qui ressemble très fortement à p21^{WAF-1} (44 % d'homologie de séquence) et qui est activée en cas d'inhibition de contact, par privation de sérum ou par le TGF- β , et induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. En s'associant avec les complexes cycline/CDK, p27^{KIP} empêche la phosphorylation des kinases et par la même occasion, leur activation (Kwon et al., 1996).

1.9.3 L'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence

L'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal) est largement utilisée comme biomarqueur de la sénescence répllicative. La β -galactosidase est une hydrolase lysosomale eucaryote dont le pH optimal est de 4,0. Sa fonction est de cliver les résidus β -galactosides d'une grande variété de substrats en monosaccharides (Kurz et al., 2000). En 1995, Dimri et son équipe ont montré que la β -galactosidase pouvait également être détectée à pH 6,0 dans une culture de fibroblastes humains sénescents. Cette activité en phase de sénescence peut être clairement différenciée de l'activité lysosomale classique (Dimri et al., 1995). Il a également été mis en évidence que cette activité à pH 6,0 permettait l'identification de fibroblastes et de kératinocytes sénescents dans des biopsies de peau provenant de donneurs âgés. Plus l'âge du donneur était élevé, plus le nombre de cellules positives à l'activité de la β -galactosidase détectée à pH 6,0 augmentait (Kurz et al., 2000). Cette activité à pH 6,0 a été renommée activité β -galactosidase associée à la sénescence (Dimri et al., 1995). Depuis, il a été montré que cette activité provenait d'une augmentation de l'expression de la β -gal et donc d'une augmentation de l'abondance des enzymes lysosomales dans les cellules sénescents (Lee et al., 2006).

1.10 La sénescence du kératinocyte

Si les trois phases de culture développées par le modèle de Hayflick correspondent bien aux phases décrites pour des types cellulaires tels que les fibroblastes, il semble que ce modèle puisse connaître des variantes dans certains types cellulaires. En effet, en ce qui concerne les kératinocytes normaux humains (NHK), il a été montré que, après la phase de croissance exponentielle, les cellules entraient en sénescence. Les cellules sénescents présentent un arrêt du cycle cellulaire, une morphologie sénescence, une augmentation de l'activité SA β -gal et une surexpression de PCNA (Gosselin et al., 2009). Toutefois, il a été montré qu'un petit nombre de kératinocytes pouvaient, après quelques jours, reprendre leurs divisions cellulaires, ceci a été décrit comme « l'émergence » (figure 17).

Après quelques divisions cellulaires, on observe de nouveau un arrêt des divisions cellulaires et une phase de « plateau » au sein de laquelle les cellules présentent de nouveau des caractéristiques sénescents. ce plateau est ensuite suivi d'une seconde phase

d'émergence Chez les kératinocytes, la régulation du cycle cellulaire et l'apparition de la sénescence sont fortement dépendantes de l'action de p21^{WAF1} qui en fonction des stress subits par la cellule peut déclencher des voies de signalisation qui mèneront à l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Weinberg and Denning, 2002).

Une autre spécificité des kératinocytes est le fait que la présence de la sous-unité catalytique de la télomérase ne les empêche pas d'entrer en sénescence. Ainsi, Kang et al. (Kang et al., 1998) ont montré que les kératinocytes oraux normaux humains (NHOK), bien qu'exprimant la télomérase, entraient en sénescence répllicative après une vingtaine de passages en culture. Les kératinocytes possèdent donc un modèle de sénescence complexe dans lequel l'expression de la télomérase est incapable d'induire à elle seule leur immortalisation.

Lors de ce mémoire, nous avons utilisé des kératinocytes NhTERT, immortalisés par la transfection du gène hTERT et par une inactivation du gène p16^{INK4a}. Ces cellules possèdent un potentiel prolifératif élevé tout en ayant gardé leur potentiel de différenciation (Dickson et al., 2000).

1.11 Sénescence induite prématurément par des stress

Il a été montré qu'il était possible d'induire de façon prématurée la sénescence de certains types cellulaires (fibroblaste, cellules endothéliales, mélanocytes, etc) en les soumettant à des stress réalisés à des doses non toxiques (Brack et al., 2000). Les principaux modèles développés ont utilisé des agents stressants induisant un stress oxydatif (H₂O₂, t-BHP) et/ou des dommages directs à l'ADN (mitomycin C, UV). Plusieurs modèles de sénescence prématurée ont été développés au laboratoire, principalement sur des fibroblastes humains.

1.12 Objectifs du mémoire

Le but de ce mémoire est de comparer deux modèles d'expositions répétées d'UVB sur des kératinocytes immortalisés (N-hTERT) ou sur des kératinocytes normaux (NHK).

Premièrement, nous avons utilisé des cellules N-hTERT qui sont des kératinocytes humains immortalisés suite à l'introduction du gène hTERT codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase et à l'inactivation du gène codant p16^{INK4a}. Ces deux modifications permettent aux kératinocytes de conserver leur pouvoir prolifératif et de ne pas entrer en sénescence répllicative. Cependant, les cellules N-hTERT conservent leur capacité à se différencier dans un épiderme *in vitro* (Dickson et al., 2000). Nous utiliserons un modèle d'exposition qui a été mis au point au laboratoire par V. Bertrand-Vallery et al. qui consiste en des expositions UVB à une intensité de 300 mJ/cm², 4 fois par jour, et ce, durant deux

jours (Bertrand-Vallery et al., 2009). Suite aux expositions UVB, il a été montré que les cellules N-hTERT entraient en différenciation de manière prématurée.

Deuxièmement, nous avons utilisé des kératinocytes normaux, ne possédant pas le gène hTERT mais possédant le gène *p16^{INK-4a}*. Le modèle d'exposition prévu pour ces cellules, qui a également été mis au point au laboratoire, consiste en des expositions UVB à une intensité de 675 mJ/cm² et ce, 3 fois sur une seule journée. Contrairement aux N-hTERT, une exposition répétée aux UVB induit chez les kératinocytes normaux une sénescence prématurée sans modification de l'état de différenciation.

Afin de confirmer ces deux modèles, 72 heures après la dernière exposition, nous analyserons la présence de différents biomarqueurs de sénescence et de différenciation. Le but étant de mettre en évidence, la présence d'une différenciation ou d'une sénescence prématurée induite par les UVB. L'expression de protéines spécifiques de la couche cornée comme la filaggrine ou l'involucrine qui sont typiques d'une différenciation tardive du kératinocyte sera étudiée. En ce qui concerne la sénescence, nous étudierons l'activité SA β -gal, l'arrêt de prolifération et l'expression de gènes associés à la sénescence du kératinocyte. L'étude de ces marqueurs nous permettra d'observer quel type de réponse est induite par les UVB dans chacun des deux modèles. Afin de mieux décrire ces deux modèles, nous réaliserons également une étude des changements d'expressions géniques en utilisant une carte microfluidique permettant l'étude de l'expression de 96 gènes associés à la physiologie de la peau.

La troisième partie de ce travail consistera en une étude des variations transcriptomiques présentes lors du photovieillissement de la peau. Afin de la réaliser, des échantillons de peau provenant de jeunes donneurs ou de donneurs plus âgés ont été utilisés. Nous étudierons les changements d'expression génique en utilisant la même carte microfluidique. Les résultats obtenus seront analysés et comparés à ceux obtenus avec les deux modèles d'expositions répétées aux UVB de kératinocytes *in vitro*.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Culture cellulaire

2.1.1 Caractéristiques des lignées utilisées

2.1.1.1 Kératinocytes N-hTERT

Les kératinocytes N-hTERT, proviennent d'une lignée de kératinocytes humains immortalisés et nous ont été fournis par le laboratoire du professeur James G. Rheinwald, Boston USA. Cette lignée a été obtenue à partir de kératinocytes primaires immortalisés par l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase (N-hTERT) et l'inactivation du gène codant p16^{INK4a} (Dickson et al., 2000).

2.1.1.2 Kératinocytes primaires

Les kératinocytes primaires ont été isolés au laboratoire de dermatologie du professeur M. Garmyn (KULeuven), à partir de prépuces provenant de jeunes donneurs (moins de 6 ans) en utilisant la technique décrite par Gilchrest (Gilchrest, 1983). De 3 à 5 passages cellulaires sont réalisés au cours des différentes expériences réalisées. La procédure d'isolation des kératinocytes a été approuvée par le comité d'éthique de la KULeuven.

2.1.1.3 Échantillons de peau

Les échantillons de peau utilisés ont été isolés au laboratoire de dermatologie (KULeuven) à partir, soit de prépuces de donneurs jeunes (N = 6, moyenne d'âge : 18 mois +/- 9 mois), ou soit de paupières de donneurs âgés (N = 6, moyenne d'âge : 73 ans +/- 15 ans). Les échantillons ont été récoltés à l'UZ Leuven suivant une procédure approuvée par le comité d'éthique de la KULeuven. Les échantillons de peau ont été traités durant une nuit à 4 °C avec de la dispase dans le but de séparer l'épiderme du derme. L'ARN a ensuite pu être extrait de l'épiderme afin d'être analysé.

2.1.2 Culture et repiquage

2.1.2.1 N-hTERT

Les kératinocytes N-hTERT sont cultivés dans des boîtes de culture stériles de 75 cm² ou de 25 cm² contenant respectivement 15 ml ou 5 ml de milieu Epilife complété avec de l'Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS) (Cascade Biologics, Portland, USA). Les cellules sont conservées dans un incubateur à 37 °C, sous une atmosphère humide contenant

Tableau 1 :

- Epilife (Cascade Biologics, USA)
- Human keratinocyte growth supplement (HKGS) (Cascade Biologics, USA)
- Trypsine + EDTA (TE) (Gibco, Royaume-Uni)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen, Belgique)
- Sérum bovin foetal (Gibco, Royaume-Uni)

Tableau 2 :

- Keratinocyte SFM (Invitrogen, Belgique)
- Extrait pituitaire bovin (Invitrogen, Belgique)
- Epidermal growth factor (Invitrogen, Belgique)
- Trypsine + EDTA (TE) (Gibco, Royaume-Uni)
- PBS (phosphate buffered saline pH 7.4 (10 mM phosphate, 0.9% NaCl))
- Serum bovin foetal (Gibco, Royaume-Uni)

5 % de CO₂. Les kératinocytes sont repiqués lorsqu'ils atteignent 70 à 80 % de confluence, afin d'éviter une différenciation dépendante de la confluence.

Matériel :

Voir tableau 1.

Méthode :

Le milieu Epilife est éliminé avant d'effectuer un bref rinçage avec 3 ml de Trypsine + EDTA (TE)/T75. La TE est ensuite décantée et 2 ml de TE sont à nouveau ajoutés pour une incubation de 2-3 minutes à 37 °C. Un examen au microscope est réalisé afin de s'assurer du détachement de toutes les cellules. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 10 ml de milieu DMEM + 10 % sérum dans un tube mis sur glace afin d'éviter une différenciation des kératinocytes. Après une centrifugation de 5 minutes à 1000 rpm, le culot cellulaire est resuspendu dans 8 ml d'Epilife. Enfin, un comptage cellulaire est réalisé à l'aide du Cell Counter (Invitrogen, Belgique), avant de réensemencer les cellules à une densité choisie. Ce comptage se réalise en mélangeant 10 µl de suspension cellulaire avec 10 µl de bleu de trypan (Invitrogen, Belgique). Le bleu de trypan va marquer les cellules mortes afin qu'elles ne soient pas prises en compte lors du comptage.

2.1.2.2 Kératinocytes primaires

Les kératinocytes primaires sont cultivés dans des boîtes de culture de 75 cm² ou de 25 cm² contenant respectivement 10 ml ou 5 ml de milieu Keratinocyte-Serum Free Medium (Keratinocyte-SFM) additionné d'extrait pituitaire bovin et d'Epidermal Growth Factor (EGF). Les cellules sont conservées dans un incubateur à 37 °C maintenant de façon constante une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Les kératinocytes sont repiqués lorsqu'ils atteignent 70 à 80 % de confluence.

Matériel :

Voir tableau 2.

Méthode :

Lors du repiquage des kératinocytes primaires, le milieu Keratinocyte-SFM complet est éliminé avant d'ajouter 10 ml de TE/T75. Les cellules sont ensuite incubées 10 minutes à 37 °C. Un examen au microscope est réalisé afin de s'assurer de la mise en suspension de toutes les cellules. Les kératinocytes sont ensuite récupérés et déposés dans un tube de 50 ml contenant 10 ml de PBS + 10 % sérum. Après une centrifugation de 8 minutes à 1200 rpm, le culot cellulaire est remis en suspension dans 10 ml de milieu Keratinocyte-SFM complet. Pour finir, un comptage cellulaire est réalisé à l'aide du Cell Counter (Invitrogen, Belgique) avant de réensemencer les cellules à une densité choisie.

Tableau 3 :

- PBS (phosphate buffered saline pH 7.4 (10 mM phosphate, 0.9% NaCl).
- Epilife (Cascade Biologics, USA)
- Human keratinocyte growth supplement (HKGS) (Cascade Biologics, USA)
- Caisson UVB muni de 3 lampes TL 20 W/01 émettant des UVB à 311 nm (Philips, Hollande)
- Radiomètre UVR avec un senseur UVB (Bioblock Scientific, Belgique)

Tableau 4 :

- PBS (phosphate buffered saline pH 7.4 (10 mM phosphate, 0.9% NaCl)
- Keratinocyte-SFM complet (Invitrogen, Belgique)
- Extrait pituitaire bovin (Invitrogen, Belgique)
- Epidermal growth factor (Invitrogen, Belgique)
- Caisson UVB muni de 3 lampes TL 20 W/01 émettant des UVB à 311 nm (Philips, Hollande)
- Radiomètre UVR avec un senseur UVB (Bioblock Scientific, Belgique)

2.1.3 Exposition aux UVB

2.1.3.1 Kératinocytes N-hTERT

Matériel :

Voir tableau 3.

Méthode :

Dans le but d'effectuer une exposition répétée aux UVB, les kératinocytes sont repiqués trois jours avant l'expérience dans des boîtes de culture, à une densité de 2 000 cellules/cm². Le protocole d'exposition aux UVB utilisé a été décrit par Bertrand-Vallery et *al.* (Bertrand-Vallery et al., 2010b). Avant chaque exposition, les cellules sont rincées avec du PBS puis incubées dans 9 ml (T75), 3 ml (T25) ou 500 µl (plaque 24 puits) de PBS. Les cellules sont ensuite exposées aux UVB à une intensité de 300 mJ/cm². L'utilisation d'un radiomètre permet de contrôler et de mesurer les radiations émises. L'exposition est répétée 4 fois par jour durant deux jours avec un intervalle de 2.5 heures entre chaque exposition. Après chaque exposition, le PBS est éliminé et du nouveau milieu est ajouté aux cellules. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes manipulations mais ne sont pas exposées aux UVB.

2.1.3.2 Kératinocytes primaires

Matériel:

Voir tableau 4.

Méthode :

Les kératinocytes primaires sont repiqués à une densité de 12,000 cellules/cm² trois jours avant le premier stress. Avant chaque exposition, les cellules sont rincées avec du PBS puis incubées dans 3 ml (T75), 1 ml (T25) ou 500 µl (plaque 24 puits) de PBS. Les cellules sont ensuite exposées aux UVB, à une intensité de 675 mJ/cm². L'utilisation du radiomètre permet une nouvelle fois de contrôler les radiations émises. L'exposition est répétée 3 fois durant une seule journée, avec un intervalle de 3 heures entre chaque exposition. Après chaque stress, le PBS est éliminé et du nouveau milieu est ajouté aux cellules. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions mais ne sont pas exposées aux UVB.

Tableau 5 :

- Kit extraction ARN Rneasy mini kit (QIAGEN, USA)
- SDS (dodécylsulfate de sodium) 1% (MP Biomedicals, Ohio).
- Ethanol 70% (Merck, Allemagne)
- Eau RNase free

Tableau 6 :

<p>- Kit transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, USA)</p> <p>Contenant :</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Anchored-oligo (dt) 18 Primer (50pmol/μl) ○ Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (5x) ○ Protector RNase Inhibitor (40U/μl) ○ Deoxynucleotide mix (10mM) ○ Transcriptor Reverse Transcriptase (20U/μl)
- Eau RNase free

2.2 Extraction d'ARN, Rétro-transcription et PCR en temps réel

2.2.1 Extraction de l'ARN

Matériel :

Voir tableau 5.

Méthode :

Avant de commencer la manipulation, il faut préparer une zone « RNase free » en nettoyant la paillasse avec du SDS 1 % afin de supprimer la présence de ribonucléases pouvant dégrader l'ARN. En effet, ces enzymes sont très stables et sont présentes partout. Le SDS est un détergent surfactant ionique qui supprime les liaisons non covalentes des protéines, permettant ainsi leur dénaturation. 72 heures après le dernier stress, l'ARN est extrait à partir de boîtes de culture. Le milieu de culture est retiré des boîtes et 350 µl de tampon RLT est ajouté sur les cellules afin de permettre leur lyse. Les cellules sont ensuite raclées et récupérées dans un eppendorf dans lequel on ajoute un volume d'éthanol 70 %. 700 µl d'échantillon sont transférés sur une colonne RNeasy pour une centrifugation de 15 secondes à 10 000 rpm. Si l'échantillon fait plus de 700 µl, cette opération est répétée jusqu'à ce que l'ensemble de l'échantillon soit passé sur la colonne. La colonne est ensuite rincée avec 700 µl de tampon RW1 suivi d'une nouvelle centrifugation de 15 secondes à 10 000 rpm. 500 µl de tampon RPE est ensuite ajouté sur la colonne suivi d'une centrifugation de 15 secondes à 10 000 rpm. Cette étape est répétée une deuxième fois suivie d'une centrifugation de 2 minutes à 10 000 rpm. Finalement, l'ARN est élué de la colonne en y déposant 30 µl à 50 µl d'eau RNase Free, suivi d'une dernière centrifugation de 1 minute à 10 000 rpm. L'ARN est ensuite dosé au spectromètre Ultraspec 2100 *pro* (Amersham Biosciences).

2.2.2 Rétro- transcription

Principe :

La rétro-transcription consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'une matrice d'ARN grâce à une transcriptase inverse ARN dépendante. Cet ADNc est généralement destiné à être amplifié par PCR.

Matériel :

Voir tableau 6.

Méthode:

La manipulation se réalise en condition « RNase free ». La première étape est la préparation d'un mélange contenant 1 µg d'ARN et de l'eau « RNase Free » jusqu'à obtenir un volume total de 12 µl, auquel est ajouté 1 µl d'anchored-oligo (dt) 18 Primer. Ce mélange est incubé 10 minutes sur un bloc thermique à 65 °C. Les échantillons sont ensuite

Tableau 7.1 :

- Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)
- ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, USA)
- Logiciel 7000 SDS (Applied Biosystems, USA)
- Eau distillée

Tableau 7.2 :

Gènes	Amorce sens	Amorces anti-sens
p21	5' - ctg gag act ctc agg gtc gaa - 3'	5' - cca gga ctg cag gct tcc t - 3'
p53	5' - aag aaa cca ctg gat gga gaa - 3'	5' - cag ctc tcg gaa cat ctc gaa - 3'
Involucrine	5' - gtg gcc acc caa aca taa ata ac - 3'	5' - cct agc gga ccc gaa ata agt - 3'
23 kDa	5' - gcc tac aag aaa gtt tgc cta tct g - 3'	5' - tga gct gtt tct tct tcc ggt agt - 3'
MMP-9	5' - cct tcc tta tcg ccg aca agt - 3'	5' - acc gac gcg cct gtg tac - 3'
IGFBP3	5' - cag agc aca gat acc cag aac ttc - 3'	5' - cac att gag gaa ctt cag gtg att - 3'
IGFBP5	5' - tgt gac cgc aaa gga ttc tac a - 3'	5' - tcc ccg tca acg tact cc at - 3'
IL8	5' - ctg gcc gtg gct ctc ttg - 3'	5' - ggg tgg aaa ggt ttg gag tat g - 3'
Fibronectine	5' - tgt ggt tgc ctt gca cga t - 3'	5' - gct tgt ggg tgt gac ctg agt - 3'
Osteonectine	5' - gag acc tgt gac ctg gac aat g - 3'	5' - gga agg agt gga ttt aga tca caa ga - 3'
GADD45A	5' - ctg agt ca cgg acg attc a - 3'	5' - gca ggc aca aca cca cgt ta - 3'
TGF-β1	5' - agg gct acc atg cca act tct - 3'	5' - ccg ggt tat gct ggt tgt aca - 3'
HSPA1A	5' - gag aag gac gag ttt gag cac aa - 3'	5' - tgg tac agt ccg ctg atg atg - 3'
PCNA	5' - aat gcg ccg gca atg a - 3'	5' - aac ttt ctc ctg gtt tgg tgc - 3'
p16	5' - gcc caa cgc gaa tag t - 3'	5' - cgc tgc cca tca tca tga c - 3'
MMP-1	5' - cat gcg cac aaa tcc ctt cta - 3'	5' - gaa cag ccc agt act tat tcc ctt t - 3'
GAPDH	5' - acc cac tcc tcc acc ttt gac - 3'	5' - gtc cac cac cct gtt gct gta - 3'
K10	5' - aat cag att ctc aac cta aca ac - 3'	5' - ctc atc cag cac cct acg - 3'
K14	5' - cga tgg caa ggt ggt gtc - 3'	5' - ggg tga agc agg gtc cag - 3'
Loricrine	5' - tca tga tgc tac ccg agg ttt g - 3'	5' - cag aac tag atg cag ccg gag a - 3'
Filaggrine	5' - ggg cac tga aag gca aaa ag - 3'	5' - cac cat aat cat aat ctg cac tac ca - 3'

additionnés de : 4 µl de transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0,5 µl de protector RNase Inhibitor, 2 µl de deoxynucleotide mix et 0,5 µl de transcriptor Reverse Transcriptase et incubés 30 min à 55 °C. Les échantillons sont ensuite chauffés 5 minutes à 85 °C, puis conservés à -20 °C.

2.2.3 PCR semi-quantitative en temps réel

Principe :

La PCR semi-quantitative en temps réel est une technique qui permet de quantifier avec sensibilité et précision l'abondance d'un ARNm. Les ARNm provenant des conditions à étudier seront préalablement transformés en ADNc via une transcription inverse (voir 2.2.2). Au cours de la PCR, le SYBR Green, un agent intercalant de l'ADN double brin, va émettre un signal fluorescent qui sera proportionnel au nombre de copies double brin d'ADN. C'est en quantifiant ce signal que l'on peut déterminer l'abondance du gène cible. Le SYBR Green étant un agent intercalant non spécifique, l'étude d'une courbe de dissociation (montée progressive de la température (de 60 °C à 95 °C) qui dissocie les amplicons) permet de contrôler la pureté de l'amplicon. La quantification est réalisée à partir du Ct (Cycle Threshold) qui permet de séparer le bruit de fond de l'amplification. Afin de normaliser les résultats, un gène de référence (housekeeping gene) dont l'expression ne varie pas d'une condition à l'autre, est analysé en même temps que les gènes d'intérêt.

Matériel :

Voir tableau 7.1.

Méthode :

Pour chaque gène, il faut réaliser un « mélange PCR » en utilisant des amorces spécifiques (voir tableau 7.2.). Ce mélange doit contenir par puits 5 µl d'ADNc dilué 100x, 2,5 µl d'amorce sens, 2,5 µl d'amorce anti-sens, 2,5 µl d'eau distillée et 12,5 µl de SYBR Green Master Mix (2x). La plaque PCR 96-puits est ensuite scellée et centrifugée 1 min à 600 rpm. La PCR est réalisée à l'aide de l'appareil ABI Prim 7900 (Applied Biosystems). Les échantillons sont chauffés 5 minutes à 95°C afin d'être dénaturés. Il s'en suit 40 cycles de 15 secondes à 95°C et de 1 minute à 60 °C permettant la liaison des amorces à l'ADNc ainsi que leur élongation.

Quantification :

La quantification des résultats est basée sur la méthode des Ct (Cycle Threshold) également appelée cycle seuil. Ce Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc présent dans l'échantillon et est atteint lorsque la fluorescence émise est supérieure au bruit de fond. L'utilisation d'un gène de référence dont l'expression ne varie pas dans les différentes conditions expérimentales permet de normaliser les résultats obtenus (Schmittgen and Livak, 2008).

Tableau 8 :

- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA) <ul style="list-style-type: none"> ○ RT buffer 10x ○ Random Primers 10x ○ dNTP mix 25x ○ MultiScribe Reverse Transcriptase 50 U/μl ○ RNase Inhibitor
- TaqMan Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, USA)
- ABI PRISM 7900HT fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)
- Eau RNase free

Tableau 9 :

- Tampon de lyse comprenant : <ul style="list-style-type: none"> ○ 580 μl d'eau distillée ○ 20 μl Triton X100 (Sigma, Belgique) ○ 200 μl PIC (Protease Inhibitor Cocktail) (Roche, Allemagne) ○ 200 μl PIB (Phosphate Inhibitor buffer) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Na_3VO_4 (Sigma, Belgique) ▪ PNPP (Sigma, Belgique) ▪ β-glycérophosphate (Sigma, Belgique) ▪ NaF (Merck, Allemagne) ○ 1 ml de tampon de lyse 2X pH7,5 constitué de : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris 80 mM. (Merck, Allemagne) ▪ KCl 300 mM. (Merck, Allemagne) ▪ EDTA 2 mM. (Gibco, Royaume-Uni)
--

2.2.4 Cartes microfluidiques TaqMan®(TLDA : TaqMan Low Density Array)

Principe :

L'utilisation de cartes microfluidiques, préchargées en sonde TaqMan (TLDA : TaqMan Low Density Array) et en amorces spécifiques, permet de mesurer simultanément l'expression de 16 à 384 gènes (gènes de référence et gènes d'intérêt). En se basant sur la littérature, une carte microfluidique a été personnalisée avec des gènes spécifiques de la biologie de la peau (voir annexe 1). Cette carte 384 puits est composée de 4 séries identiques de 96 gènes comprenant 4 gènes de référence et 92 gènes d'intérêt.

Matériel :

Voir tableau 8.

Méthode :

Avant d'utiliser les cartes microfluidiques, la qualité de l'ARN est contrôlée avec l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Le RIN (RNA Integrity Number) permet d'estimer la qualité de l'échantillon d'ARN. Plus la qualité de l'ARN est bonne, et plus le RIN se rapproche de 10.

Une concentration de 2 µg d'ARN est rétro-transcrite en utilisant le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems) et l'ADNc est ensuite stocké à -20°C. La rétro-transcription se réalise en condition « RNase free ». La première étape est la préparation sur glace d'un mélange de RT contenant 2 µl de RT buffer, 0,8 µl de dNTP mix, 2 µl de RT random primers, 1 µl MultiScribe reverse transcriptase, 1 µl de RNase inhibitor et 3,2 µl de Nuclease-free H₂O. Ce mélange de RT sera ajouté à 10 µl d'ARN (2 µg) et d'eau distillée. Le cycle de rétro-transcription se compose de 10 minutes à 25 °C suivi de 120 minutes à 37 °C, puis de 5 secondes à 85 °C.

Afin d'effectuer la PCR, un mélange PCR contenant 50 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 50 µl l'ADNc (100ng) et d'eau RNase free est réalisé. 100 µl de ce mélange sont déposés dans chaque réservoir et la carte est ensuite centrifugée 2 fois à 12 000 rpm pendant 1 minute. La plaque est ensuite scellée. Les cycles PCR sont constitués de 2 minutes à 50 °C, 10 minutes à 94.5 °C suivis de 40 cycles de 30 secondes à 97 °C et 1 minute à 59.7 °C.

2.3 Analyse des protéines (extraction – dosage – western blot – immunofluorescence)

2.3.1 Extraction des protéines

Matériel :

Voir tableau 9.

Tableau 10 :

-	Solution de Bradford (Bio-Rad, Allemagne)
-	BSA (2mg/ml) (Thermo Fisher Scientific, USA)
-	Eau distillée
-	Tampon de lyse utilisé lors de l'extraction de protéines

Tableau 11.1 :

-	<p>Gel concentrateur</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 1,25 de tris-HCl 0,5 M pH 6,8 SDS 0,4 % (Merck, Allemagne) ○ 500 µl d'acrylamide 30% ;Bisacr 0,8% (Bio-Rad Laboratories, Canada) ○ 5µl de temed (Amersham Biosciences, Sweden) ○ 500 µl d'APS (ammonium persulphate) (Amersham Biosciences, Sweden) ○ 2,75 ml d'eau distillée
-	<p>Gel séparateur</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 2,5 ml de tris-HCl 1,5 M pH 8,8 SDS 0,4 % (Merck, Allemagne) ○ 3,33 ml d'acrylamide 30% ;Bisacr 0,8% (Bio-Rad Laboratories, Canada) ○ 5µl de temed (Amersham Biosciences, Sweden) ○ 500 µl d'APS (ammonium persulphate) (Amersham Biosciences, Sweden) ○ 3,67 ml d'eau distillée
-	<p>Tampon d'électrophorèse pH 8,3-8,5 contenant :</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Tris-HCl 25 mM (Merck, Allemagne) ○ Glycine 0,192 M (Merck, Allemagne) ○ SDS 0,1 % (MP Biomedicals, Ohio)

Méthode :

Remplacer le milieu de culture des boîtes par 150 µl/T75 de tampon de lyse. Les cellules sont ensuite raclées et récoltées dans un eppendorf sur glace. Une centrifugation de 10 minutes à 13 000 rpm et à 4 °C permet de culotter les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines est récupéré dans un nouvel eppendorf et stocké à -20 °C.

2.3.2 Dosage des protéines par la méthode Bradford

Principe :

La technique de Bradford est un dosage colorimétrique basé sur un changement d'absorbance. Lorsque des protéines sont mises en présence de bleu de Coomassie, celui-ci change de couleur suite aux liaisons avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant par la même occasion la concentration en protéines dans l'échantillon.

Matériel :

Voir tableau 10.

Méthode :

Avant de commencer, la solution de Bradford est diluée 5 fois avec de l'eau distillée avant d'être filtrée et conservée à l'abri de la lumière. Chaque condition, c'est-à-dire les échantillons, le tampon de lyse, la BSA et le blanc sont mesurés en double. Chaque tube préparé est rempli avec 1 ml de solution de Bradford puis toutes les 30 secondes, on ajoute les conditions à mesurer : 2,5 µl de BSA et d'eau et 2 µl d'échantillon et de tampon de lyse. 5 minutes plus tard, les conditions sont mesurées au spectromètre à une longueur d'onde de 595 nm. Entre chaque mesure, la cuvette est rincée avec de l'acétone puis avec de l'eau.

2.3.3 Western Blot SDS PAGE

Principe :

La technique de western blot permet d'analyser l'abondance des protéines dans des lysats cellulaires. Les protéines sont préparées en conditions dénaturantes et sont chargées sur un gel d'acrylamide en présence de SDS. Comme il n'y a plus d'effet ni de la charge de la protéine ni de la forme, la migration permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Les extraits protéiques seront ensuite transférés sur une membrane PVDF LF millipore qui sera mise en présence des anticorps primaires et secondaires afin de permettre la révélation des protéines.

Matériel :

Voir tableau 11.

- Tampon de transfert.
○ Tris-HCl 40 mM (Merck, Allemagne)
○ Glycine 0,307 M (Merck, Allemagne)
○ Methanol (Janssen Chimica, USA)
- PBS (phosphate buffered saline pH 7.4 (10 mM phosphate, 0.9% NaCl)
- Tween 20 (Amersham Biosciences, Sweden)
- PBS-Tween 0,1% (Amersham Biosciences, Sweden)
- Bleu de charge 5x
○ 10 ml de tris-HCl 0,5 M pH 8 (Merck, Allemagne)
○ 10 ml de SDS 20 % (MP Biomedicals, Ohio)
○ 5 ml de 2-Mercaptoethanol (Fluka Biochemica, Suisse)
○ 10 ml de glycérol (Merck, Allemagne)
○ 17,5 mg de bleu de bromophénol (Merck, Allemagne)
- Agent bloquant Licor (Licor Bioscience, USA)
- Anticorps secondaire (Licor Bioscience, USA)
○ Anti-souris 800 ou 700
○ Anti-lapin 800 ou 700
- Etalon SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard. (Invitrogen, Belgique)
- Membrane PVDF LF millipore (Millipore Corporation, USA)

Tableau 11.2

Protéines	Dilution	Firme
p53	1 000x	Oncogene (USA)
p21	1 000x	Cell Signalling (USA)
Involucrine	50 000x	Harbor Bioproduct (Belgique)
p16	1 000x	Santa Cruz Biotechnology (USA)

Méthode :

Le gel séparateur (Tableau 11.1) est coulé entre deux plaques de verre étanches. Une fois le gel coulé, on le recouvre avec de l'isobutanol saturé en eau afin de tasser le gel et de l'isoler de l'oxygène ambiant qui est un inhibiteur de la réaction de polymérisation. Lorsque la polymérisation est terminée, on retire l'isobutanol et on rince la surface du gel avec de l'eau distillée jusqu'à ce que tout l'isobutanol soit retiré. Après cette étape, on coule un gel concentrateur (tableau 11.1). Au cours de la polymérisation, on prépare les échantillons pour obtenir une concentration finale de 10 à 15 µg de protéines mis à volume avec du Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 SDS 0,4 %. Ensuite, les échantillons sont additionnés de bleu de charge 5x contenant du SDS afin de charger négativement les protéines, du β-mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures, du glycérol qui alourdit l'échantillon et du bleu de bromophénol qui permet la visualisation du front de migration. Les échantillons sont ensuite chauffés 4 minutes à 100 °C et centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm. Les échantillons et l'étalon sont à ce moment prêts à être chargés dans les puits. Le tampon d'électrophorèse (tableau 11.1) est versé dans la cuve et dans la partie centrale du support de manière à recouvrir les puits, le couvercle est mis en place et la migration est réalisée à 200V. Lorsque la migration est terminée, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF LF millipore via un montage en « sandwich ». Ce montage se compose de 2 éponges, 2 papiers wattman, la membrane PVDF LF millipore, le gel, 2 papiers wattman et 2 éponges. Les papiers wattman et les éponges sont préalablement rincés dans du tampon de transfert alors que la membrane a été trempée 1 minute dans du méthanol et 5 minutes dans du tampon de transfert. Le transfert se réalise en 2 heures à 162 mA. Une fois le transfert terminé, on bloque la membrane avec de l'agent bloquant Licor dilué 2x dans du PBS durant 1 heure à température ambiante ou une nuit à 4 °C. La solution bloquante sera jetée et remplacée par l'anticorps primaire dilué (tableau 11.2) de manière appropriée dans l'agent bloquant Licor non dilué contenant 0,1 % de tween 20. Après une nouvelle incubation d'une heure, la membrane est lavée 4 fois 5 minutes au PBS-Tween 0,1 % (PBS-T). Ensuite, l'anticorps secondaire dilué 5 000x dans l'agent bloquant Licor/0,1 % tween20 est mis en contact avec la membrane pour une incubation d'une heure à température ambiante. La membrane est ensuite lavée 4 fois 5 minutes avec du PBS-T PBS-Tween 0,1 % (PBS-T) suivi de 2 lavages avec du PBS sans Tween. La dernière étape avant de pouvoir scanner la membrane est de la faire sécher 1 heure à 37 °C. Les membranes sont ensuite scannées et quantifiées à l'aide du scanner Odyssey.

2.3.4 Immunofluorescence**Principe :**

L'immunofluorescence consiste à détecter une protéine d'intérêt au sein des cellules par l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre cette protéine d'intérêt. Des anticorps anti-immunoglobulines sont ensuite ajoutés dans le but de reconnaître les anticorps primaires. Ces anticorps secondaires sont couplés chimiquement à des fluorochromes qui lors d'une excitation à une longueur d'onde appropriée émettent de la lumière.

Tableau 12 :

-	Plaque multi puits (Costar, New York)
-	Lamelle couvre-objet de 13 mm de diamètre (Assistent, Allemagne)
-	Lames porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (VWR, Belgique)
-	PBS (phosphate buffered saline pH 7.4 (10 mM phosphate, 0.9% NaCl))
-	BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma, Belgique)
-	PFA (Paraformaldéhyde) (Sigma, Belgique)
-	Triton X-100 1 % (Sigma, Belgique)
-	Anticorps primaires dilués dans du PBS +3 % BSA <ul style="list-style-type: none"> ○ Involucrine (Harbor Bioproduct, Belgique) dilué 40x ○ Filaggrine (Neomarkers, USA) dilué 40x ○ Caspase-3 active (Promega, USA) dilué 100x
-	Anticorps secondaire : <ul style="list-style-type: none"> ○ Anticorps anti-IgG de souris (Molecular Probes, Pays-Bas) ou de lapin (Molecular Probes, Pays-Bas) marqué au fluorochrome Alexa vert 488, dilué 1000x dans du PBS + 3% BSA
-	TO-PRO-3 (Molecular probes, Pays-Bas)
-	RNase free
-	Mowiol (Sigma, Belgique)
-	Microscope confocal (Leica, Allemagne)

Matériel :

Voir tableau 12.

Méthode :

72 h après le dernier stress, les kératinocytes sont repiqués à raison de 20 000 cellules/lamelle couvre-objet. Les cellules sont fixées durant 10 minutes dans du PBS + 4 % PFA. Ensuite, les cellules sont rincées 3 fois 5 minutes avec du PBS. Ensuite, les cellules sont incubées dans du PBS + Triton X-100 1 % pendant 5 minutes afin de perméabiliser les membranes et de permettre l'accès des anticorps. Les cellules sont à nouveau rincées 2 fois 5 minutes, dans du PBS + 3 % BSA. L'anticorps primaire est dilué de manière adéquate dans du PBS + 3 % BSA et 30 µl d'anticorps primaire spécifique est déposé sur de la parafilm. La lamelle couvre-objet est déposée par-dessus. Les lamelles couvre-objets sont ensuite déposées en chambre humide et incubée toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, les cellules sont rincées 3 fois dans du PBS + 3 % BSA et l'anticorps secondaire est dilué dans du PBS + 3 % BSA. Toujours en chambre humide, 30 µl d'anticorps secondaire est déposé sur de la parafilm, la lamelle couvre-objet est déposée par-dessus pour une incubation d'une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont à nouveau rincées 3 fois dans du PBS + 3 % BSA et une fois dans du PBS. Le marquage des noyaux se réalise ensuite à l'aide de TO-PRO-3 dilués 80 fois dans du PBS + RNase 2 mg/ml. Après une incubation de 35 minutes à température ambiante, les cellules sont finalement rincées 3 fois dans du PBS avant d'être montées sur des lames de microscope en verre à l'aide de Mowiol préchauffé à 60 °C.

2.4 Test de survie cellulaire : Test MTT

Principe :

Les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium], et le clivent en son dérivé formazan formant ainsi des cristaux de coloration mauve insolubles en milieu aqueux. Cette réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. En condition toxique, le nombre de cellules capables de réaliser cette réaction diminue et une corrélation peut être établie entre la viabilité cellulaire et la quantité de MTT réduit.

Matériel :

Voir tableau 13.

Méthode :

Les cellules sont repiquées à une densité de 2 000 cellules/cm² dans des boîtes de pétri d'un diamètre de 6 cm et exposées aux UVB sous différentes intensités. 24 heures après le dernier stress, 500 µl de solution de coloration est ajouté au milieu. On incube ensuite les cellules 2 heures à 37 °C + 5% CO₂. Une fois l'incubation terminée, on enlève le surnageant et les boîtes sont rincées deux fois avec du PBS puis séchées. Ensuite, on ajoute 500 µl de solution de lyse dans chaque boîte pour une incubation de 2 heures à 37 °C avec une petite

Tableau 13 :

<ul style="list-style-type: none"> - Colorant MTT constitué de MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltérazolium] préparé à une concentration de 2,5 mg/ml dans du PBS (Sigma, Belgique)
<ul style="list-style-type: none"> - Solution de lyse préparée à partir de 2 volumes de SDS 30 % (Merck, Allemagne) (dilué dans de l'eau distillée et chauffé à 37 °C) et d'un volume de N,N-diméthyl-formamide (Janssen Chimica, Belgique). Le pH de la solution est ensuite ajusté à 4,7 en ajoutant quelques gouttes d'une solution acide (acide acétique 80 % : HCl 1 N/9/1)

Tableau 14 :

<ul style="list-style-type: none"> - Solution de fixation : <ul style="list-style-type: none"> o 2 % formaldéhyde (Belgolabo, Allemagne) o 0,2 % glutaraldéhyde (Fluka, Pays-Bas)
<ul style="list-style-type: none"> - Tampon phosphate, pH6 : <ul style="list-style-type: none"> o 87,7 ml NaH₂PO₄ 0,1 M (Merck, Allemagne) o 12,3 ml Na₂HPO₄ 0,1 M (Merck, Allemagne)
<ul style="list-style-type: none"> - Solution de coloration : <ul style="list-style-type: none"> o 2 ml de tampon phosphate, pH6. o 0,5 ml d'une solution 0,1 M de ferrocyanure de potassium (Merck, Allemagne) o 0,5 ml d'une solution 0,1 M de ferricyanure de potassium (Merck, Allemagne) o 0,6 ml d'une solution de NaCl 2,5 M (Merck, Allemagne) o 20 µl d'une solution de 1 M de MgCl₂ (Merck, Allemagne) o 6,18 ml d'eau distillée. o 0,5 ml d'une solution de x-gal (20 mg/ml dilué dans du N,N,diméthylformamide)

agitation (lyse et solubilisation des cristaux). Le dosage est réalisé une heure plus tard au spectromètre à 570 nm.

2.5 Détection de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal)

Principe :

Il a été mis en évidence par Dimri et *al.* (Dimri et al., 1995) que plusieurs types cellulaires humains, lorsqu'ils ont atteint un état de sénescence, expriment de la β -galactosidase détectable à pH 6. Ce marqueur, présent chez les cellules sénescents, ne l'est pas chez les cellules présénescents.

Matériel :

Voir tableau 14.

Méthode :

72 heures après le dernier stress UVB, les kératinocytes sont repiqués dans une plaque 6-puits à raison de 2 000 cellules/cm². 24 h après le repiquage, les cellules sont rincées 2 fois au PBS avant d'être fixées pendant 5 minutes dans la solution de fixation. Il s'en suit deux nouveaux rinçages au PBS avant l'ajout de la solution de coloration. Les cellules sont ensuite incubées de 12 à 16 heures à 37 °C sans CO₂. Les puits sont ensuite rincés 2 fois au PBS et 1 fois au méthanol. La dernière étape consiste à laisser sécher les puits à température ambiante et à compter 400 cellules par puits.

2.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test t de Student (ns : non significatif, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ et *** : $P < 0.001$ en comparaison avec le contrôle).

3. Résultats

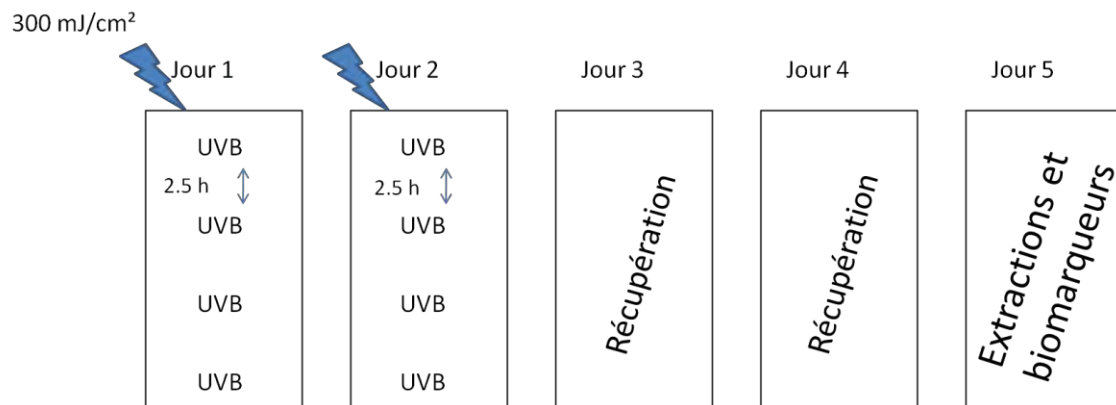


Figure 1 : Représentation schématique du modèle de stress UVB utilisé pour les kératinocytes N-hTERT. Les cellules sont exposées aux UVB 8 fois sur 2 jours, et ce, à une intensité de 300 mJ/cm² pour chaque exposition.

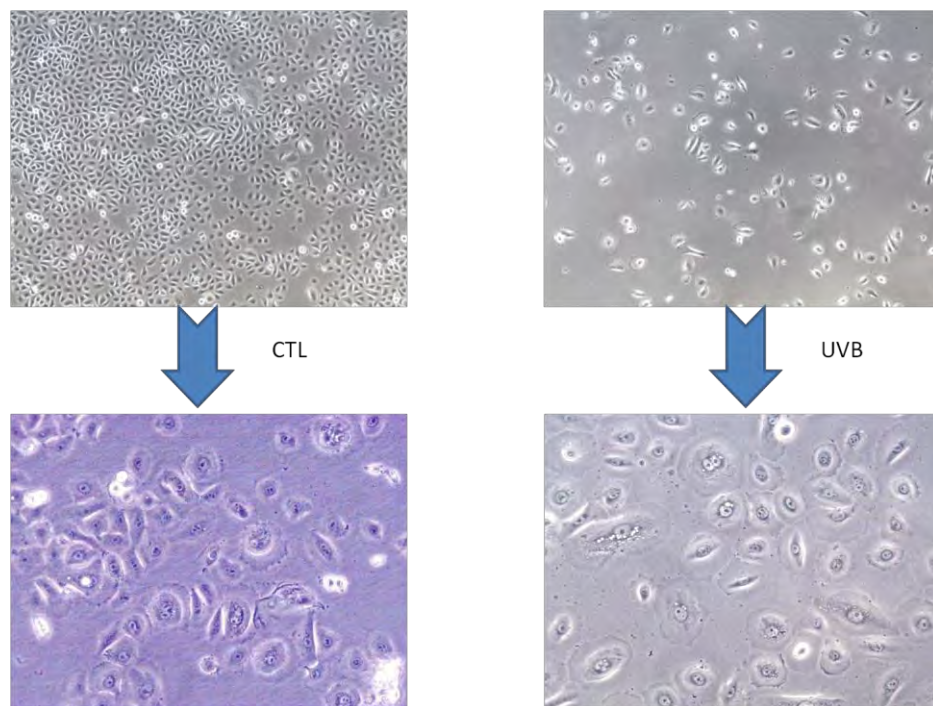


Figure 2 : Photographies de cellules N-hTERT, exposées (UVB) ou non (CTL) aux UVB. Les cellules ont été observées à 72 heures après la dernière exposition avec un microscope à contraste de phase.

Survie cellulaire des N-hTERT après expositions UVB

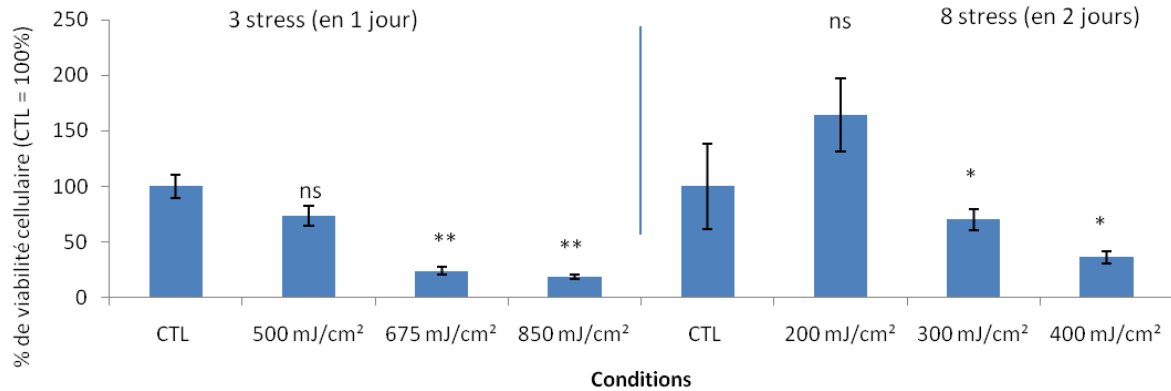


Figure 3 : Test de survie cellulaire (MTT) sur les kératinocytes N-hTERT. Les cellules ont été exposées aux UVB ou non (CTL) en utilisant le protocole d'exposition prévu pour les kératinocytes N-hTERT (8 stress en deux jours) ainsi que celui prévu pour les kératinocytes primaires (3 stress en une journée).

Le but de notre mémoire est de comparer deux modèles d'expositions répétées d'UVB sur des kératinocytes immortalisés (N-hTERT) ou sur des kératinocytes normaux (NHK). Nous évaluerons l'état de différenciation, l'état de sénescence ainsi que les modifications de l'expression génique présente après une exposition répétée aux UVB.

3.1 Étude des effets à long terme des UVB sur les kératinocytes immortalisés (N-hTERT)

Les cellules N-hTERT sont des kératinocytes humains immortalisés suite à l'introduction du gène hTERT codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase et à l'inactivation du gène codant *p16^{INK-4a}*. Malgré cela, ces kératinocytes conservent leur capacité à proliférer et à se différencier *in vitro* dans un épiderme reconstruit (Dickson et al., 2000). V. Bertrand-Vallery et al. ont mis en évidence que lorsqu'on expose des N-hTERT aux UVB, ils entrent en différenciation de manière prématurée plutôt qu'en sénescence (Bertrand-Vallery et al., 2009). Le modèle développé au laboratoire consiste en des expositions UVB à une intensité de 300 mJ/cm², 4 fois par jour, et ce, durant deux jours (Bertrand-Vallery et al., 2009) (Figure 1). Afin d'étudier la réponse à long terme aux stress UVB, les biomarqueurs de sénescence et de différenciation ainsi que les différentes extractions seront réalisés à 72 heures après le dernier stress UVB, afin d'étudier la réponse à long terme des cellules. En Figure 2, se trouvent des photographies des cellules N-hTERT exposées ou non aux UVB, après la période de récupération. Nous pouvons remarquer que les cellules exposées aux UVB semblent plus grandes que les cellules contrôles. Dans un premier temps, nous avons vérifié que les conditions de stress utilisées sont bien subcytotoxiques. Ensuite, nous avons analysé l'apparition de marqueurs de sénescence et de différenciation. Enfin, nous avons réalisé une étude des modifications de l'expression génique par PCR en temps réel classique et par l'utilisation de cartes microfluidiques TaqMan® spécifiques de la physiologie de la peau.

3.1.1 Mesure de la survie cellulaire des N-hTERT suite aux expositions répétées aux UVB

Afin de confirmer que les doses utilisées n'induisaient aucune toxicité et puisque nous travaillons avec deux protocoles d'expositions différents en fonction du type cellulaire utilisé, nous avons réalisé un test de survie cellulaire : un test MTT (cfr : Matériel et Méthodes). Nous avons donc vérifié la survie à 24 heures après le dernier stress. Deux séries indépendantes ont été testées : 3 stress en une journée ou 8 stress répartis sur deux jours.

Dans les deux cas, nous avons exposé les cellules à la dose prévue par le protocole à savoir 300 mJ/cm² pour les 8 expositions et 675 mJ/cm² pour les 3 expositions. En plus de cela, comme montré en Figure 3, nous avons également testé une dose inférieure et une dose supérieure pour chacun des modèles d'expositions.

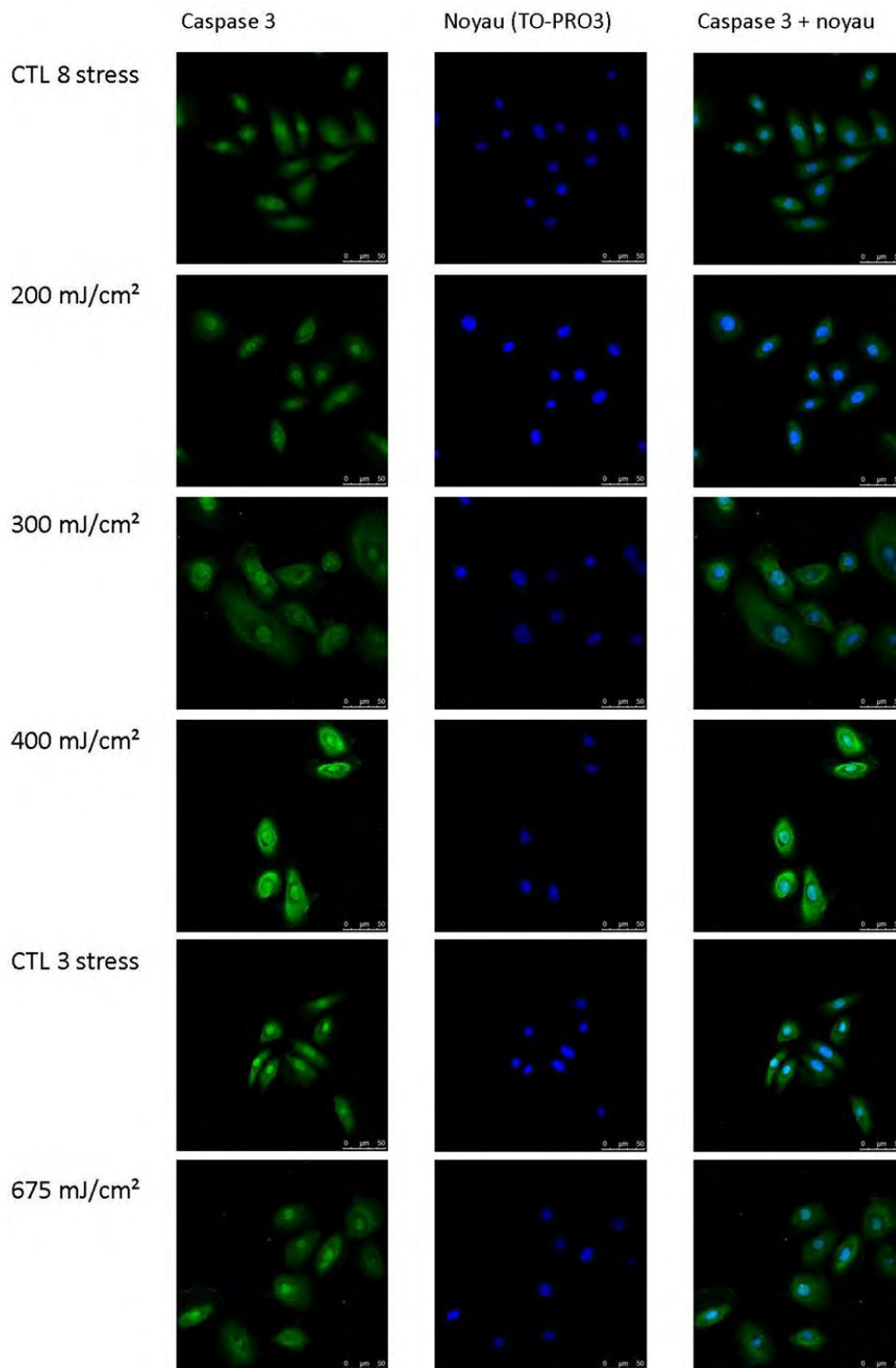


Figure 4 : Détection de la caspase 3 active par marquage en immunofluorescence chez les cellules N-hTERT exposées à 3 ou 8 stress répétés aux UVB. Le marquage en immunofluorescence a été réalisé 72 h après la dernière exposition aux UVB. La protéine a été marquée avec un anticorps anti-caspase-3 active et les noyaux avec du TO-PRO-3.

Nous avons observé que lorsqu'on stressait les cellules N-hTERT en utilisant le protocole prévu pour les kératinocytes primaires, soit trois fois par jour, la mortalité était statistiquement très importante lorsque l'on atteignait ou dépassait les 675 mJ/cm². En revanche, lorsque l'on utilisait le protocole prévu pour ce type cellulaire c'est-à-dire 8 stress étalés sur deux jours, les cellules supportaient correctement la dose des 300 mJ/cm². On peut en déduire que 300 mJ/cm² est la dose sublétales et optimale pour l'exposition des cellules N-hTERT.

3.1.2 Mesure de l'apoptose des N-hTERT suite aux expositions répétées aux UVB

Afin de s'assurer que la dose de 300 mJ/cm² (8 stress) n'induisait pas d'apoptose, nous avons réalisé un marquage par immunofluorescence des cellules à 72 heures après le dernier stress UVB. Ce marquage a été réalisé avec un anticorps reconnaissant la forme active de la caspase 3 (Figure 4). Les cellules ont été exposées 8 fois aux doses 200, 300 et 400 mJ/cm² ainsi que 3 fois à 675 mJ/cm².

En ce qui concerne le modèle de 8 stress répétés, nous voyons que l'abondance de la protéine n'augmente pas entre les cellules contrôles et les cellules exposées à 200 mJ/cm² et 300 mJ/cm², ce qui est en accord avec les résultats obtenus lors du test de survie cellulaire réalisé précédemment dans lequel on n'observait aucune mortalité cellulaire avec ces doses. Lorsque les cellules sont exposées à 300 mJ/cm², on observe une légère augmentation de l'abondance de la protéine au niveau du cytoplasme qui peut sans doute être expliqué par le fait que la morphologie des cellules est différente. Comme dit précédemment, les cellules sont plus grandes et plus étalées. Une fois qu'on atteint la dose de 400 mJ/cm², le marquage devient plus intense, montrant une activité de la caspase 3 et laissant supposer qu'il y a bien de l'apoptose dans ces cellules. Ces résultats sont en accord avec le test de survie obtenu précédemment. En ce qui concerne le modèle de 3 stress répétés, on observe qu'à la dose de 675 mJ/cm², l'intensité du marquage ne semble pas différente de celle détectée chez les cellules contrôles. Cependant, comme il y a très peu de survie cellulaire à 24 heures après que les kératinocytes N-hTERT aient été exposés 3 fois à 675 mJ/cm², ceci s'explique peut-être par le fait que les cellules mortes se sont détachées de la boîte et qu'on ne détecte plus d'apoptose chez les cellules survivantes à 72 heures après le dernier stress.

Les résultats obtenus lors du test de survie cellulaire et du marquage de l'apoptose confirment que le modèle d'expositions aux UVB des N-hTERT, soit 8 stress de 300 mJ/cm² répartis sur deux jours, est bien subcytotoxique et n'induit pas d'apoptose.

3.1.3 Étude des marqueurs de sénescence

3.1.3.1 Activité SA β -gal

L'activité SA β -gal est connue pour augmenter lors de la sénescence *in vitro*, mais également lors du vieillissement *in vivo*. Il a été montré que l'activité SA β -gal augmentait chez des kératinocytes provenant d'un épiderme de donneur âgé (Dimri et al., 1995).

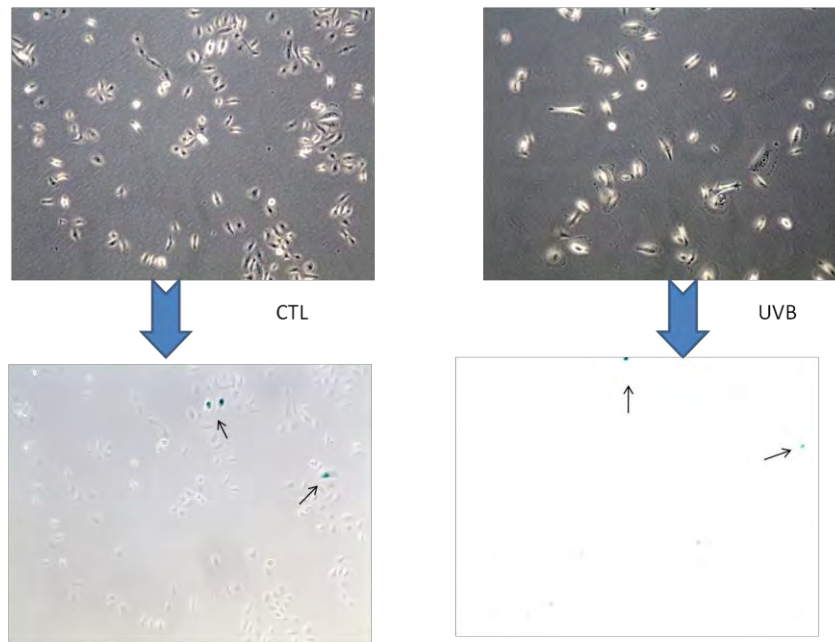


Figure 5 : Photographies des cellules N-hTERT exposées ou non à 8 stress UVB à 300 mJ/cm² après marquage cytochimique de la SA β -gal. Les cellules sont observées avec un microscope à contraste de phase 16 heures après la coloration SA β -gal. Les cellules positives à la SA β -gal sont de couleur bleue et sont pointées par une flèche.

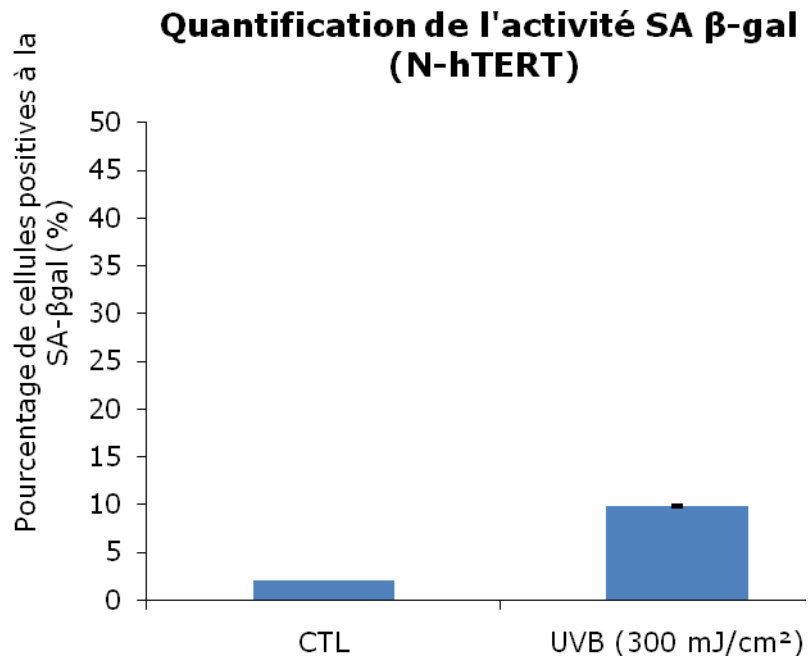


Figure 6 : Proportion de cellules N-hTERT positives à la SA β -gal suite à 8 stress UVB à 300 mJ/cm² en comparaison avec des cellules N-hTERT qui n'ont pas été exposées (CTL).

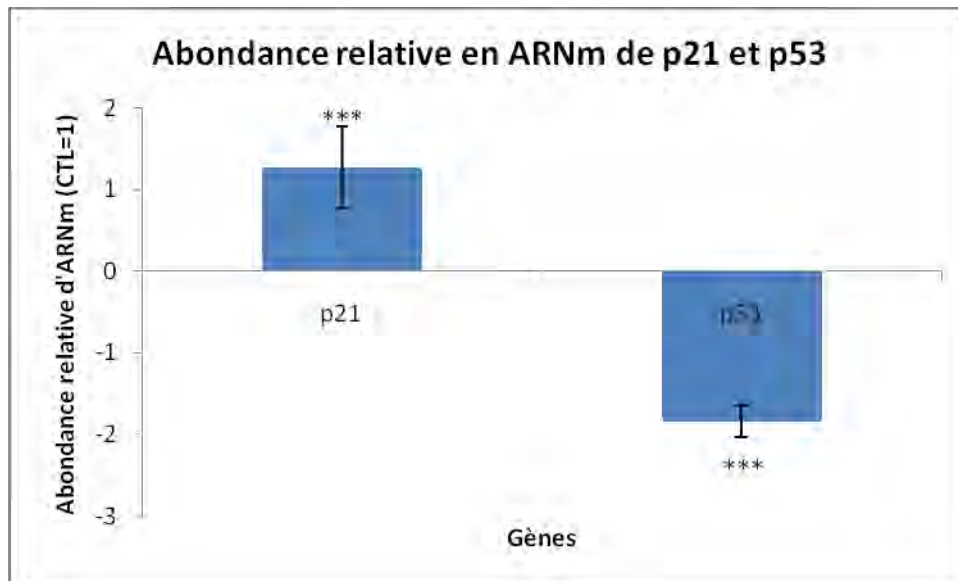


Figure 7 : Étude de l'abondance relative en ARNm de p21^{WAF-1} et p53 chez les N-hTERT après 8 expositions aux UVB à 300mJ/cm². L'ARN a été extrait 72 h après le dernier stress et la PCR en temps réel a été réalisée. 23kDa a été choisi comme gène de référence lors de l'analyse des résultats. Les résultats (moyenne de triplicats +/- écart type) sont exprimés comme le rapport entre l'abondance relative de l'ARNm présent dans les cellules contrôles par rapport aux cellules stressées (CTL=1) (***: $P < 0.001$).

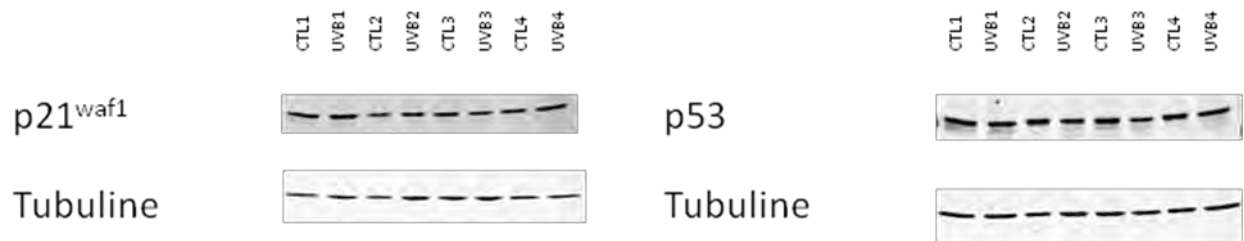


Figure 8 : Analyse de l'abondance relative des protéines p21^{WAF-1} et p53 par Western blot. Les N-hTERT ont été exposés (UVB) ou non (CTL) à 8 expositions répétées d'UVB à 300 mJ/cm². Les protéines ont été extraites à 72 h après le dernier stress, dans 4 cultures indépendantes (notées 1 à 4). La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.

Afin d'observer si une exposition répétée aux UVB induisait l'apparition d'une sénescence prématurée chez les N-hTERT, nous avons réalisé un marquage de l'activité SA β -gal à 72 heures après le dernier stress UVB chez des cellules stressées et contrôles (Figure 5).

La quantification du comptage de cellules positives montrées en Figure 6 montre que la proportion de cellules positives à l'activité SA β -gal augmente de 2 % dans les cellules contrôles à 10 % dans les cellules stressées aux UVB. On observe en effet peu de différences entre les cellules contrôles et les cellules stressées. Le pourcentage de cellules positives après le dernier stress reste dans des valeurs relativement basses, confirmant les résultats présentés par Bertrand-Vallery *et al.* (Bertrand-Vallery *et al.*, 2009). On peut donc en déduire que les kératinocytes N-hTERT soumis à 8 stress UVB ne semblent pas entrer en sénescence.

3.1.3.2 Arrêt du cycle cellulaire

Un autre marqueur de sénescence est l'arrêt du cycle cellulaire. Étant donné que $p16^{INK-4a}$ n'est pas exprimé dans les kératinocytes N-hTERT, nous avons mesuré les niveaux d'abondance relative d'ARNm et protéique de $p21^{waf-1}$ et $p53$, deux acteurs clefs de l'arrêt du cycle cellulaire

Au niveau ARNm (Figure 7), on détecte une surexpression de 1,9 x de $p21^{waf-1}$ chez les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles. Par contre, nous observons une répression de $p53$ de 1,8 x chez les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles. Au niveau protéique (Figure 8), on ne détecte aucune différence significative des niveaux d'abondance relative de $p53$, mais on distingue une légère augmentation de $p21^{waf-1}$. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par V. Bertrand-Vallery *et al.* (Bertrand-Vallery *et al.*, 2009). En effet, il semble que l'arrêt du cycle cellulaire dans ce modèle soit marqué plutôt à court temps après le dernier stress (16-40 heures) avec une modification d'abondance importante de $p21^{waf-1}$ et $p53$.

3.1.3.3 Modification de l'expression génique

Un autre biomarqueur de la sénescence est la modification de l'expression génique. Nous avons analysé l'expression de gène associé à la sénescence chez le kératinocyte tels que MMP-1, MMP-9, la fibronectine et l'ostéonectine (Kang *et al.*, 2003). Ces gènes codent pour les métalloprotéinases 1 et 9, responsables de la dégradation des constituants de la MEC (matrice extra cellulaire) et de la fibronectine et ostéonectine, protéines sécrétées et présentes dans la MEC. Nous avons également étudié l'expression de l'IL-8, impliquée dans l'inflammation (Perera *et al.*, 2006). Enfin, nous avons aussi mesuré l'expression de l'insuline like growth factor binding protein 3 et 5 (IGFBP-3 et 5) et du transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1), également surexprimé chez les kératinocytes sénescents (Kang *et al.*, 2003).

Comme montré en Figure 9 nous avons observé une surexpression significative de l'ARNm de 5,2 x pour *MMP9* que de la *fibronectin* et *IL-8* et *TGF- β 1* de respectivement 3,7 et 2,7 x chez les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles. En revanche, l'*ostéonectine*, l'*IGFBP-3* et 5 subissent une répression significative de respectivement 1,4, 13,7 et 18,1 x chez les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles. Une exposition

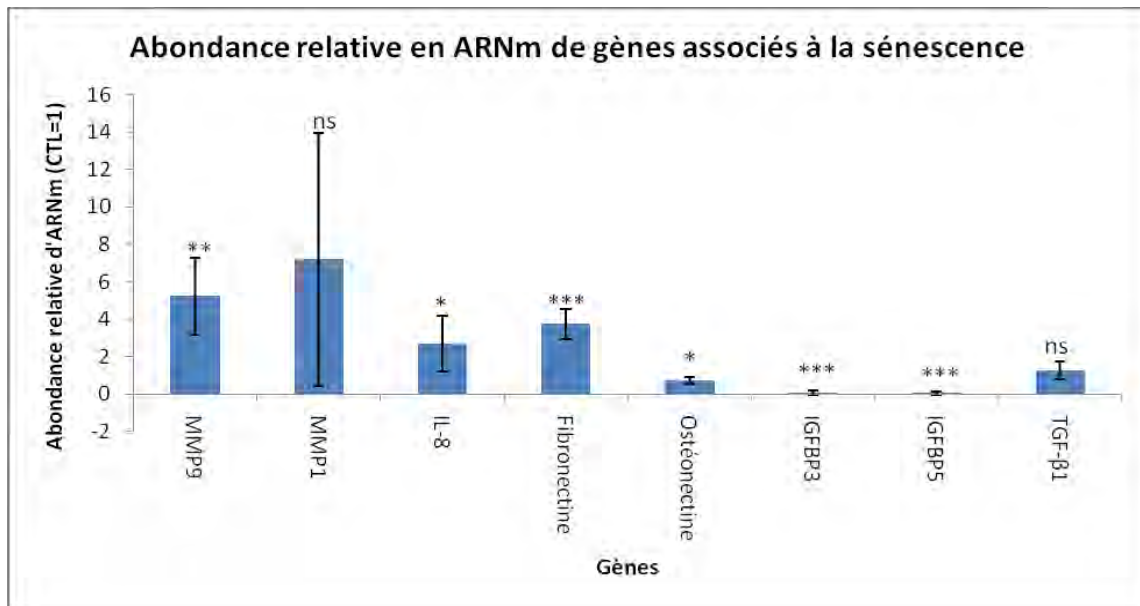


Figure 9 : Étude de l'abondance relative en ARNm de MMP9, MMP1, IL-8, fibronectine, ostéonectine, IGFBP3, IGFBP5 et TGF-β1 chez les N-hTERT après 8 expositions aux UVB à 300mJ/cm². L'ARN a été extrait 72 h après le dernier stress et la PCR en temps réel a été réalisée. 23kDa a été utilisé comme gène de référence lors de l'analyse des résultats. Les résultats (moyenne de triplicats +/- écart type) sont exprimés comme le rapport entre l'abondance relative de l'ARNm présent dans les cellules contrôles par rapport aux cellules stressées (CTL=1) (ns : non significatif, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$).

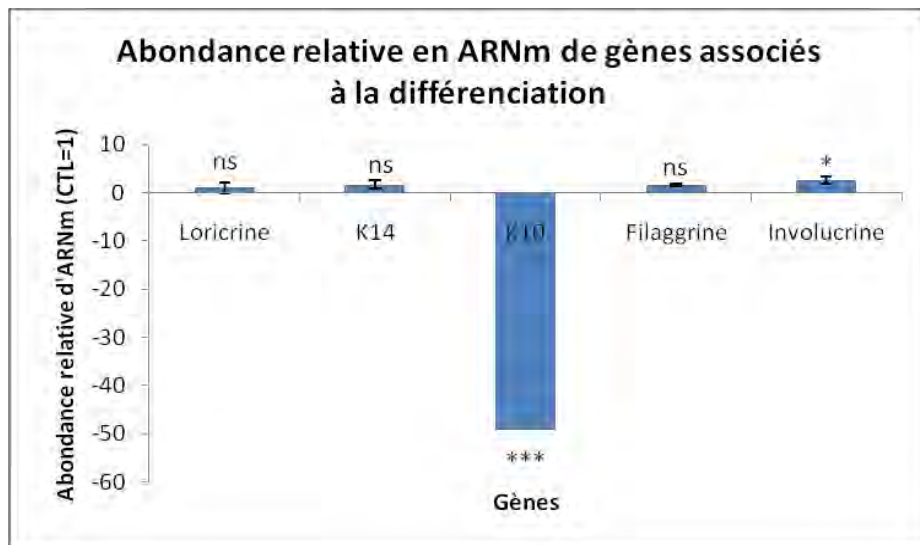


Figure 10 : Étude de l'abondance relative en ARNm de la loricrine, K14, K10, filaggrine et involucrine chez les N-hTERT après 8 expositions aux UVB à 300mJ/cm². L'ARN a été extrait 72 h après le dernier stress et la PCR en temps réel a été réalisée. 23kDa a été utilisé comme gène de référence lors de l'analyse des résultats. Les résultats (moyenne de triplicats +/- écart type) sont exprimés comme le rapport entre l'abondance relative de l'ARNm présent dans les cellules contrôles par rapport aux cellules stressées (CTL=1) (ns : non significatif, * : $P<0.05$, ***: $P<0.001$).

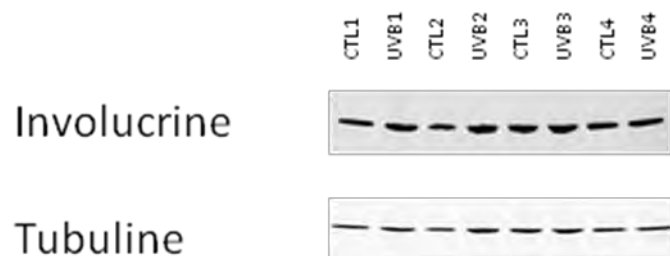


Figure 11 : Analyse de l'abondance relative de l'involucrine par Western blot. Les N-hTERT ont été exposés (UVB) ou non (CTL) à 8 expositions répétées d'UVB à 300 mJ/cm². Les protéines ont été extraites à 72 h après le dernier stress, dans 4 cultures indépendantes (notées 1 à 4). La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.

répétée aux UVB induit la production de métalloprotéinases matricielles en activant des voies spécifiques de transduction du signal, ce qui confirme que l'organisation de la matrice extracellulaire subit des modifications durant la différenciation. Il y a également présence d'une inflammation durant la cornification, et ceci a été observé via une augmentation de l'abondance de l'ARNm de l'*IL-8*.

3.1.4 Étude des marqueurs de la différenciation des kératinocytes

Après avoir mis en évidence qu'aucune sénescence significative n'apparaissait après une exposition répétée aux UVB, nous avons voulu observer si des biomarqueurs de différenciation tardive étaient présents dans ce modèle d'expositions répétées aux UVB.

Pour cela, 72 heures après le dernier stress, nous avons analysé les niveaux d'abondance relative en ARNm et en protéines de deux marqueurs de la différenciation tardive des kératinocytes : l'involucrine et la filaggrine. L'involucrine est un composé précoce très important de la couche cornée puisqu'elle s'associe à une variété d'autres protéines structurales de celle-ci, par conséquent, elle est un bon biomarqueur de la différenciation tardive des kératinocytes. La filaggrine intervient également dans la formation de la couche cornée, mais cette fois, en s'associant avec des filaments intermédiaires de kératine afin de les aligner. En plus de cela, la filaggrine intervient dans l'osmorégulation de la couche cornée. La loricrine est exprimée dans la couche granuleuse et est le principal composant de la couche cornée puisqu'elle constitue entre 70 et 85 % de sa masse totale. Sa fonction principale est le renforcement de la couche cornée au niveau de son cytoplasme. La kératine 14 quant à elle est exprimée par les kératinocytes basaux. La kératine 10 est un marqueur de différenciation précoce que l'on retrouve *in vivo* que chez les kératinocytes confluents (Poumay and Pittelkow, 1995).

3.1.4.1 Étude de l'abondance relative en ARNm de marqueurs de différenciation

Au niveau de l'ARNm, nous avons analysé par PCR en temps réel l'abondance relative des ARNm codant pour les protéines involucrine et filaggrine, mais également de la loricrine, de la kératine 10 (K10) et de la kératine 14 (K14).

Lorsqu'on observe les résultats obtenus en Figure 10, nous détectons une répression significative de la K10 (49,3 x) et une surexpression significative (2,8 x) de l'involucrine chez les cellules N-hTERT exposées aux UVB en comparaison avec les cellules contrôles. Ceci confirme le fait que les kératinocytes N-hTERT exposés aux UVB entrent en différenciation tardive et en accord avec les résultats obtenus par V. Bertrand-Vallery.

3.1.4.2 Étude de l'abondance relative protéique de l'involucrine

Après avoir observé une surexpression de l'ARNm de l'involucrine, nous avons étudié son abondance protéique par Western blot à 72 heures après le dernier stress UVB. Les résultats en Figure 11, montrent également une augmentation de l'abondance de la protéine lorsque les cellules N-hTERT sont exposées aux UVB. Ces résultats confirment ceux obtenus au niveau de l'ARNm par PCR en temps réel et sont en accord avec les résultats précédemment obtenus au laboratoire (Bertrand-Vallery et al., 2010a).

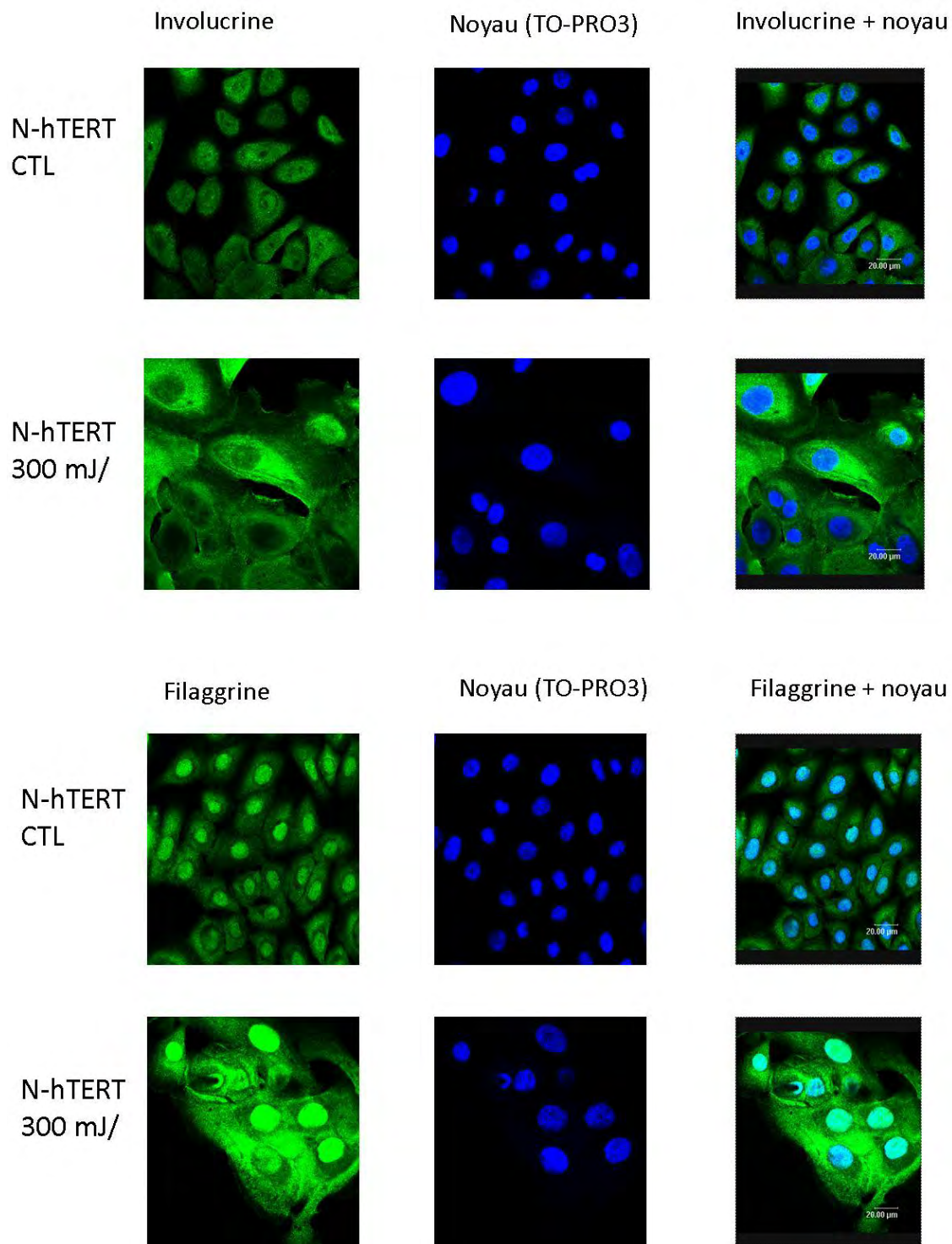


Figure 12 : Détection de l'involucrine et de la filaggrine par marquage en immunofluorescence chez les cellules N-hTERT exposées à 8 stress répétés aux UVB. Ce marquage a été réalisé 72 h après la dernière exposition aux UVB. Les protéines ont été marquées avec un anticorps anti-involucrine ou anti-filaggrine et les noyaux avec du TO-PRO-3.

3.1.4.3 Étude de l'abondance et de la localisation de marqueurs de différenciation tardive par immunofluorescence

Afin d'observer les modifications d'abondance et la localisation de deux marqueurs de différenciation tardive que sont l'involucrine et la filaggrine, nous avons réalisé un marquage en immunofluorescence de ces deux protéines chez les N-hTERT à 72 heures après le dernier stress UVB (Figure 12).

Nous observons une forte augmentation de l'abondance de l'involucrine chez les N-hTERT ayant été exposés aux UVB comparativement aux cellules contrôles. De même, nous remarquons également une forte augmentation de l'abondance de la filaggrine chez les cellules stressées. Ceci permet de confirmer les observations faites par Bertrand-Vallery et *al.* quant à l'induction d'une différenciation des cellules N-hTERT lorsqu'elles sont exposées aux UVB.

3.1.5 Analyse de l'expression génique par cartes microfluidiques TaqMan®

Les résultats obtenus jusqu'à ce stade nous permettent de confirmer ceux obtenus par V. Bertrand-Vallery à savoir que les kératinocytes N-hTERT soumis à des expositions répétées aux UVB entrent en différenciation tardive prématurée plutôt qu'en sénescence. Afin de réaliser une description plus complète de ce modèle, nous avons décidé d'analyser les modifications d'expression génique en utilisant des cartes Microfluidiques TaqMan® (Applied Biosystems). Ces cartes, réalisées sur demande, ont été spécifiquement élaborées afin de permettre l'étude simultanée de l'expression de 92 gènes impliqués dans la physiologie de la peau (Annexe1) ainsi que 4 gènes de référence. Les résultats obtenus sur 4 cultures indépendantes avec les cartes Microfluidiques TaqMan® après une analyse statistique (test t de Student) sont montrés en Figure 13a pour les gènes surexprimés et en Figure 13b pour les gènes réprimés.

14 gènes ont montré une surexpression significative de l'abondance relative de leur ARNm. Parmi ces gènes, on retrouve des gènes intervenant dans l'apoptose comme *BCL2-associated X protein (BAX)* dont la protéine fait partie de la famille des protéines *BCL2*. Les membres de cette famille peuvent former des homo ou des hétérodimères qui vont agir comme régulateur pro ou antiapoptotique. Ces protéines sont impliquées dans une grande variété d'activité biologique. *BAX* va former un hétérodimère avec *BCL2* et agir en tant qu'activateur apoptotique (Zhang et al.).

On trouve également des gènes intervenant dans l'arrêt du cycle cellulaire parmi lesquels on retrouve la *cycline D1 (CCND1)*, qui fait partie de la famille des cyclines et qui intervient dans la régulation du cycle cellulaire. Cette cycline interagit avec CDK4 et CDK6, dont les activités sont nécessaires au cycle cellulaire pour passer de la phase G1 à la phase S. Une surexpression de la cycline D1 peut altérer la progression du cycle cellulaire. Par contre, la *tumor protein p53 (TP53)* qui répond à divers stress cellulaires en régulant des gènes qui induisent l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la réparation de l'ADN ou des changements dans le métabolisme est réprimée après les stress UVB (Abraham, 2001).

Des gènes intervenants dans le remodelage de la matrice extracellulaire ou dans l'adhérence cellulaire comme le *collagène de type XVII, alpha 1 (COL17A1)* qui code pour la chaîne alpha du collagène de type XVII. Ce collagène est une protéine transmembranaire qui

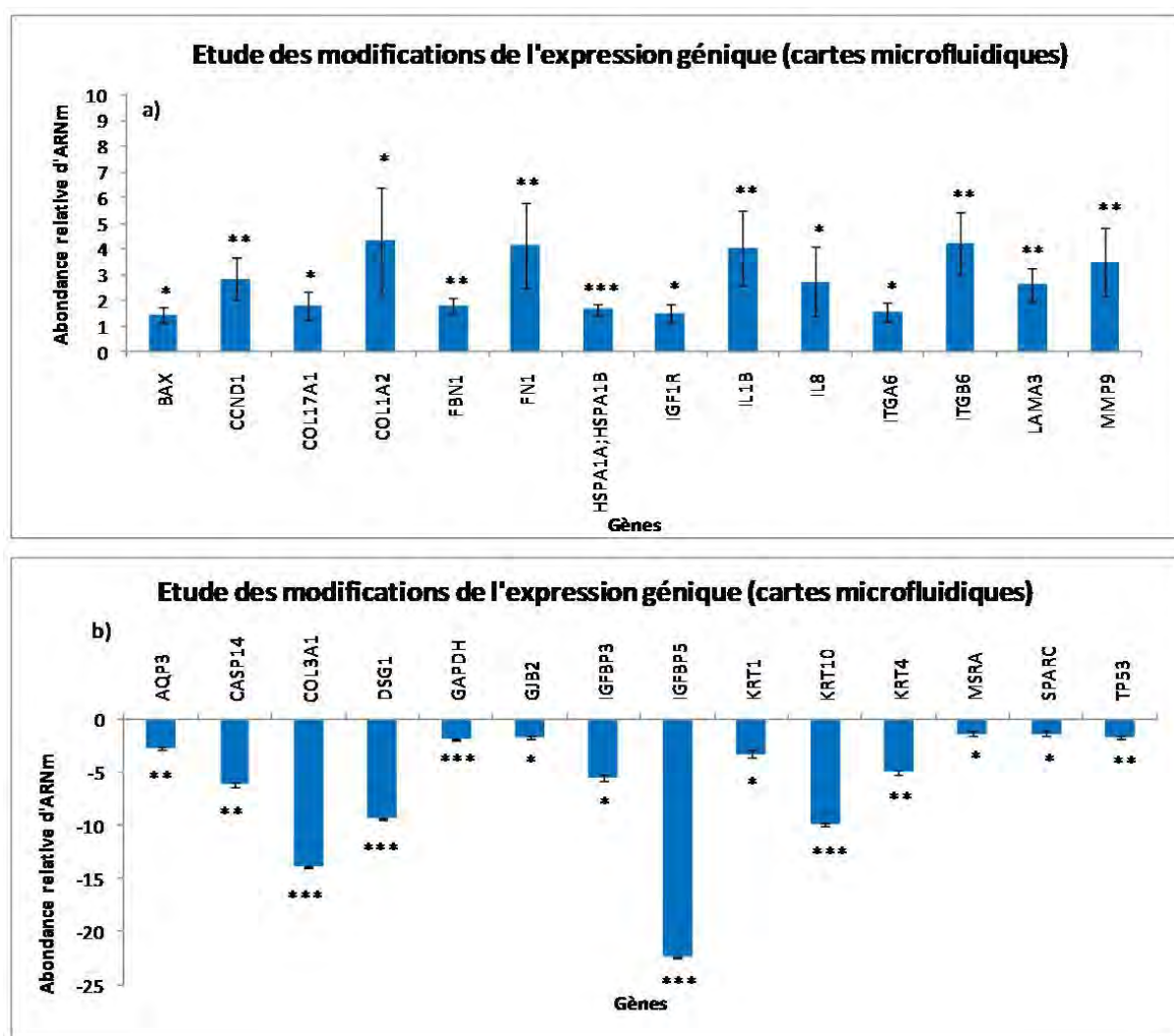


Figure 13 : Étude des modifications de l'expression génique par carte microfluidique TaqMan® sur des kératinocytes N-hTERT après 8 expositions répétées aux UVB. L'ARN a été extrait à 72 heures après le dernier stress UVB et préalablement vérifié par l'Agilent 2100 Bioanalyzer. Le gène 18s a été utilisé comme gène de référence. La moyenne des résultats +/- écart type (N = 4) a été analysée par un test statistique (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ et ***: $P < 0.001$). Les gènes dont l'abondance relative en ARNm est surexprimée (a) et réprimée (b) chez les cellules stressées sont exprimés par rapport aux cellules contrôles.

	MMP9	Fibronectine	IL-8	GAPDH	Osteonectine	p53	KRT10	IGFBP3	IGFBP5
PCR en temps réel	5,25	3,74	3,08	-1,68	-1,40	-2,19	-49,26	-18,09	-13,72
Carte microfluidique	3,51	4,15	2,74	-1,89	-1,31	-1,66	-9,91	-5,53	-22,42

Figure 14 : Confirmation par PCR en temps réel des résultats obtenus par carte microfluidique TaqMan®. 9 gènes possédant une variation d'expression dans les cartes Micro Fluidic TaqMan® ont été analysés par PCR en temps réel avec utilisation du SYBR Green en utilisant 23kDa comme gène de référence.

intervient dans la structure des hémidesmosomes qui sont des complexes multiprotéiques situés sur la membrane basale dermo-épidermique et permettent l'adhérence des kératinocytes sur la membrane sous-jacente. Le *collagène type I alpha 2 (COL1A2)* est un gène codant pour la chaîne pro-alpha2 du collagène de type I. Ce collagène est présent abondamment dans le derme. On retrouve également une surexpression de la *fibriline (FBN)* et de la *fibronectine (FNI)*, dont les protéines sécrétées sont présentes dans la matrice extracellulaire. La fibronectine intervient dans les processus d'adhérence. L'*integrine alpha et beta 6 (ITGA6, ITGB6)* sont également surexprimées. La *laminine alpha 3 (LAMA)* est un membre de la famille des laminines, glycoprotéines qui constituent le constituant majeur, avec le collagène, de la lame basale. Avec la fibronectine, les laminines servent de substrat pour la migration cellulaire. La *métalloprotéinase 9 (MMP9)* fait partie des métalloprotéinases matricielles et intervient dans la destruction de la matrice extracellulaire lors de processus physiologiques normaux comme le développement embryonnaire ou le remodelage de tissus (Hakki et al., 2009). La présence d'une modification d'abondance de ces gènes met en évidence un remodelage de la matrice extracellulaire lorsque les cellules sont exposées aux UVB

À côté de cela, nous avons obtenu 14 gènes qui ont subi une répression de leurs ARNm. Ces gènes interviennent également dans le remodelage de la matrice extra cellulaire. Le *collagène de type III alpha I (COL3A1)* qu'on trouve dans les tissus conjonctifs comme la peau, le système vasculaire ou les intestins par exemple et s'associe avec le collagène de type I. L'*osteonectine (SPARC)* qui est une protéine associée à la matrice influençant la synthèse de la matrice extracellulaire (Hakki et al., 2009).

Nous trouvons également des gènes intervenant dans la différenciation des kératinocytes comme les kératine 1 et 10 (*KRT1 ; KRT10*) qui sont spécifiquement exprimées dans la couche épineuse et granuleuse de l'épiderme. La kératine 4 (*KRT4*) qui est spécifiquement exprimée dans les épidermes œsophagiens ou muqueux, et ce, avec les kératines 13. La répression de kératine précoce spécifique de la différenciation des kératinocytes confirme la différenciation alternative de ce modèle. La caspase 14 (*CASP14*) qui fait partie de la famille des caspases joue un rôle dans le phénomène de l'apoptose. L'expression et le clivage de cette caspase intervient dans la différenciation terminale des kératinocytes. Les insulin-like growth factor binding protein 3 et 5 (*IGFBP3 ; IGFBP5*) sont également réprimées.

3.1.6 Confirmation de l'analyse des cartes microfluidiques TaqMan® par PCR en temps réel

Dans le but de confirmer les résultats obtenus par les cartes microfluidiques TaqMan®, nous avons réalisé plusieurs contrôles par PCR en temps réel en utilisant le SYBR Green comme agent intercalant. Nous avons sélectionné 9 gènes qui étaient exprimés différemment dans les cellules exposées aux UVB dans les cartes microfluidiques. Les résultats obtenus (Figure 14), montrent que les valeurs obtenues pour chacun des gènes varient de manière similaire, quelle que soit la technique PCR utilisée. Nous confirmons la surexpression des gènes *IL-8*, *MMP9* et *fibronectine*, ainsi que la répression des gènes *GAPDH*, *l'ostéonectine*, *p53*, la *kératine 10*, *IGFBP3* et *IGFBP5* dans des ordres de grandeur similaires, quelque soit la technique utilisée. Ces résultats confirment donc les résultats obtenus par carte microfluidique.

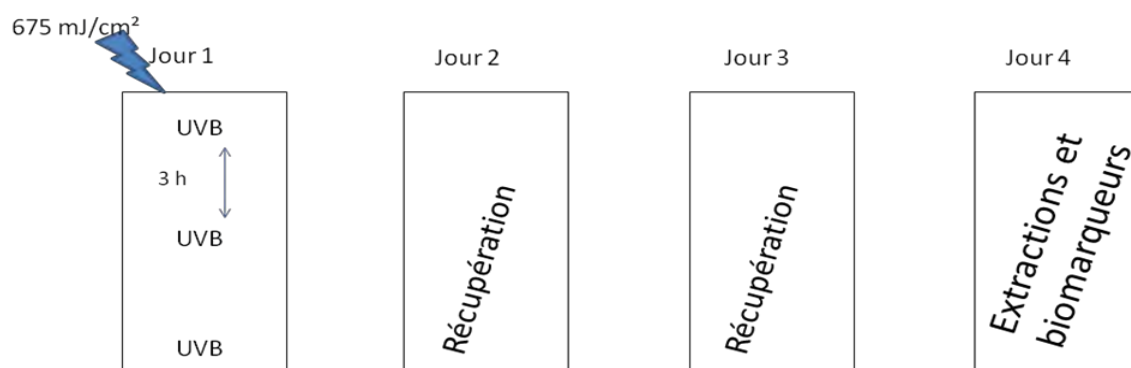


Figure 15 : Représentation schématique du modèle de stress UVB utilisé pour les kératinocytes NHK. Les cellules sont exposées aux UVB 3 fois en une journée, et ce, à une intensité de 675 mJ/cm² pour chaque exposition.

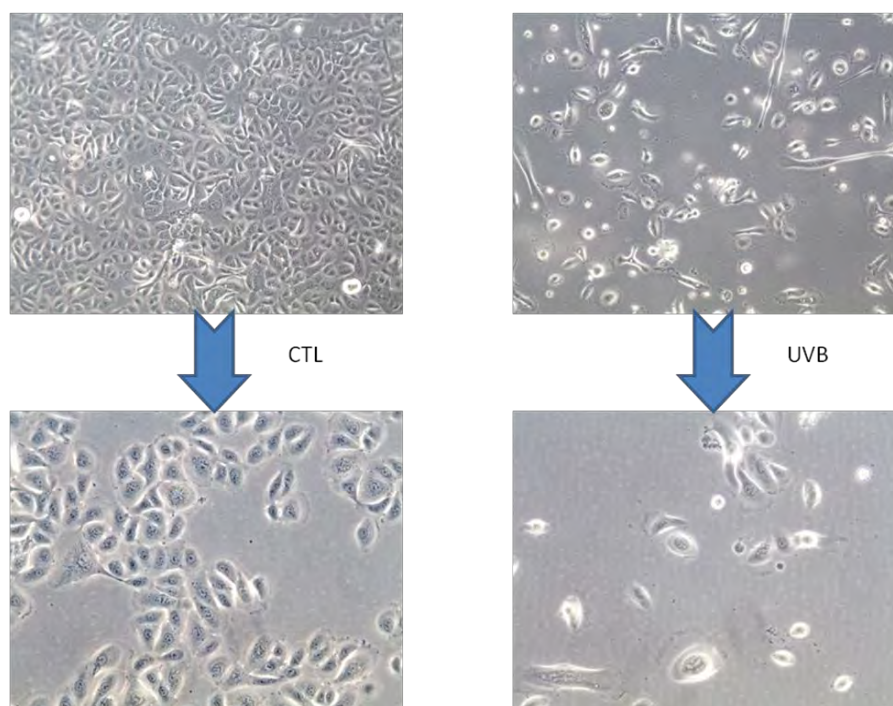


Figure 16 : Photographies de cellules NHK exposées (UVB) ou non (CTL) aux UVB. Les cellules ont été observées à 72 heures après la dernière exposition avec un microscope à contraste de phase.

Survie cellulaire des NHK après expositions UVB

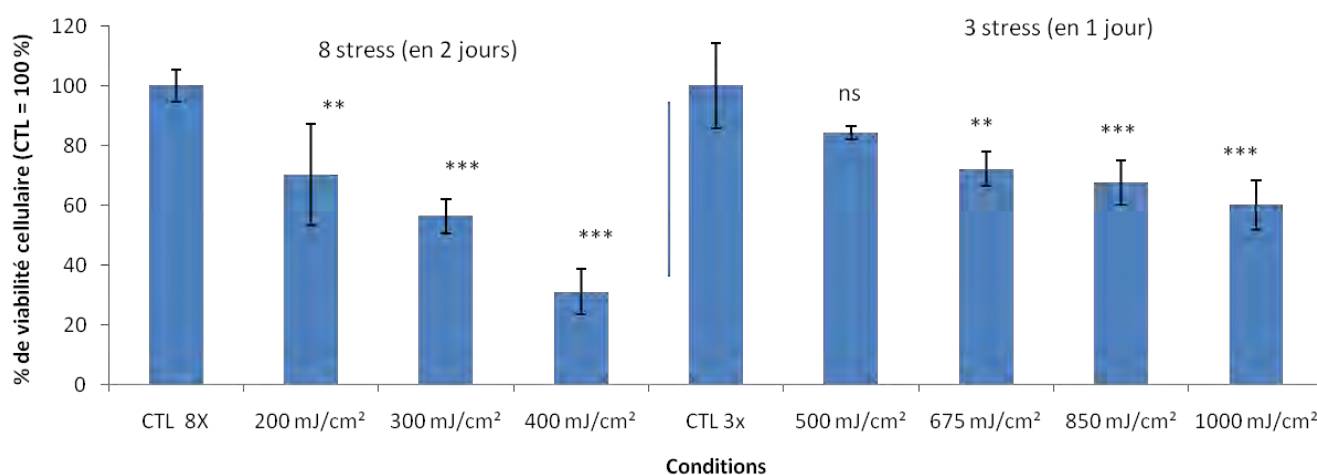


Figure 17 : Test de survie cellulaire (MTT) sur les kératinocytes NHK. Les cellules ont été exposées aux UVB ou non (CTL) en utilisant le protocole d'exposition prévu pour les kératinocytes N-hTERT (8 stress en deux jours) ainsi que celui prévu pour les kératinocytes primaires (3 stress en une journée).

3.2 Étude des effets à long terme des UVB sur des kératinocytes humains normaux (NHK)

Le second modèle que nous avons utilisé est un modèle de stress mis au point au laboratoire sur des kératinocytes NHK exposés aux UVB à une intensité de 675 mJ/cm², 3 fois par jour (Figure 15). Afin d'étudier la réponse à long terme aux stress UVB dans ce modèle et de le comparer au modèle sur N-hTERT, nous avons analysé la présence de biomarqueurs de sénescence et de différenciation et réalisé les différentes extractions à 72 heures après le dernier stress UVB, afin d'étudier la réponse à long terme aux stress. En Figure 16 se trouvent des photographies des kératinocytes NHK exposés ou non aux UVB, après la période de récupération. Nous observons la présence de cellules plus grandes chez les NHK exposés aux UVB. Nous avons d'abord vérifié que les conditions de stress utilisées sont bien subcytotoxiques. Ensuite, nous avons analysé l'apparition de marqueurs de sénescence et de différenciation. Enfin, nous avons réalisé une étude des modifications de l'expression génique par PCR en temps réel classique et par l'utilisation de cartes microfluidiques TaqMan® spécifiques de la physiologie de la peau.

3.2.1 Mesure de la survie cellulaire des NHK suite aux expositions répétées aux UVB

Sur le même principe que pour les N-hTERT, nous avons voulu observer l'impact que peuvent avoir différentes doses d'UVB sur la viabilité des NHK. Nous avons donc réalisé un test MTT et vérifié la survie cellulaire à 24 heures après le dernier stress. Deux séries indépendantes ont été testées : 3 stress en une journée ou 8 stress répartis sur deux jours.

Comme montrés en Figure 17, nous avons observé que lorsqu'on stressait les NHK en utilisant le protocole prévu pour les kératinocytes N-hTERT, soit 8 fois sur deux jours, la mortalité était croissante avec l'augmentation des doses. En revanche, lorsqu'on utilisait le protocole prévu pour ce type cellulaire soit 3 stress sur une journée, les cellules supportaient correctement les doses bien qu'une légère mortalité de l'ordre de 10 % en plus qui apparaît avec l'augmentation de l'intensité des doses.

3.2.2 Mesure de l'apoptose des NHK suite aux expositions répétées aux UVB

Afin de s'assurer que la dose de 675 mJ/cm² (3 stress) n'induisait pas d'apoptose, nous avons réalisé un marquage par immunofluorescence des cellules à 72 heures après le dernier stress UVB. Tout comme pour les N-hTERT, ce marquage a été réalisé avec un anticorps reconnaissant la forme active de la caspase 3 (Figure 18). Les cellules ont été exposées 8 fois à la dose 300 mJ/cm² ainsi que 3 fois à 675 mJ/cm².

Nous pouvons voir que ni lorsque les cellules sont exposées à 300 mJ/cm² ni lorsqu'elles sont exposées à 675 mJ/cm², l'abondance de la caspase 3 active augmentait par rapport aux cellules contrôles, et qu'on ne détecte donc pas d'apoptose lorsque les cellules

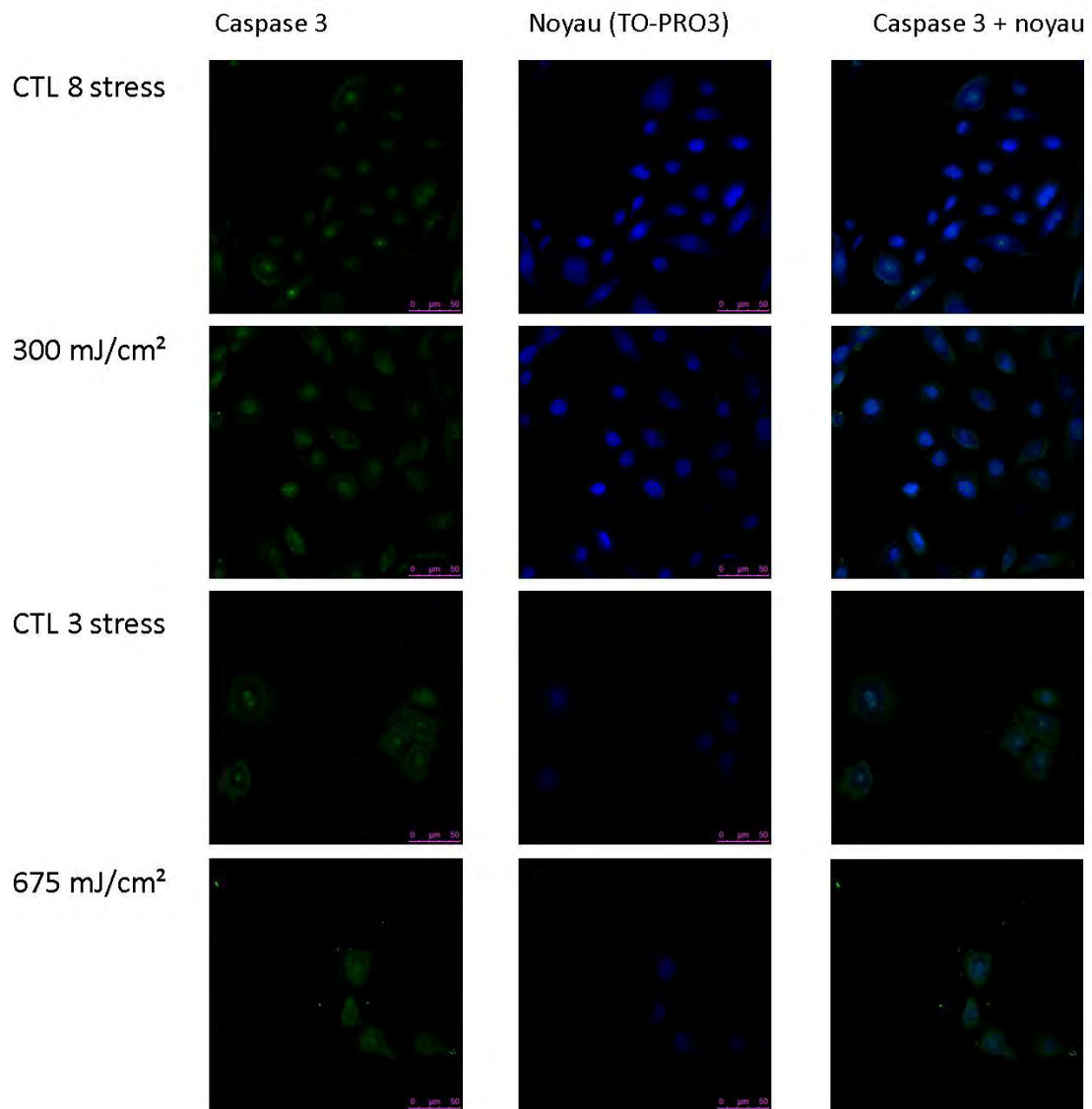


Figure 18 : Détection de la caspase 3 active par marquage en immunofluorescence chez les cellules NHK exposées à 3 ou 8 stress répétés aux UVB. Ce marquage en immunofluorescence a été réalisé 72 h après la dernière exposition aux UVB. La protéine a été marquée avec un anticorps anti-caspase-3 active et les noyaux avec du TO-PRO-3.

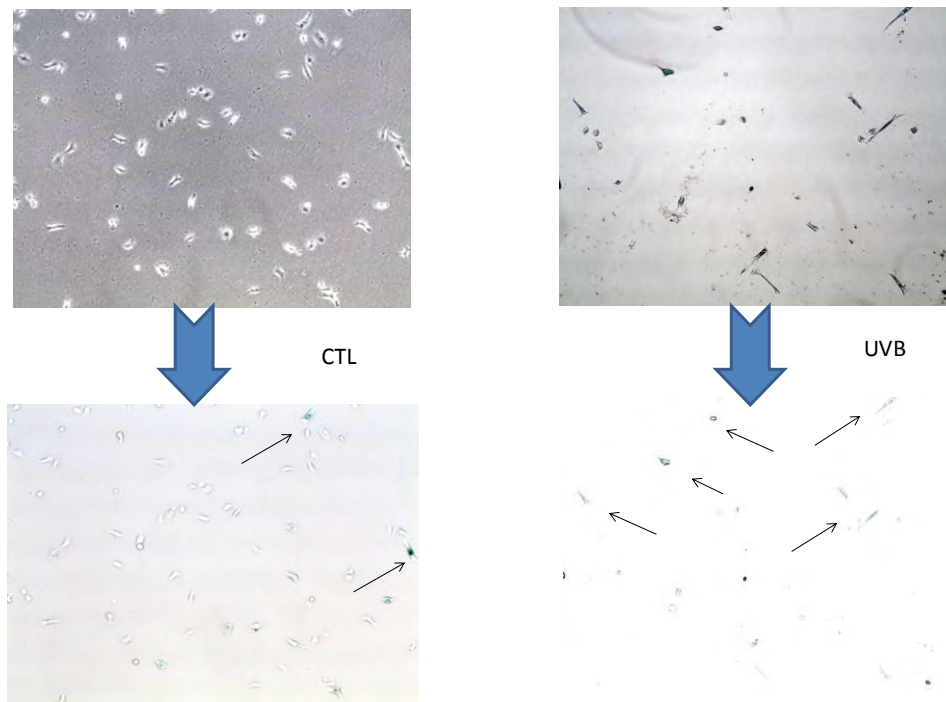


Figure 19 : Photographies des cellules NHK exposées ou non à 3 stress UVB à 675 mJ/cm² après marquage cytochimique de la SA β-gal. Les cellules sont observées avec un microscope à contraste de phase 16 heures après la coloration SA β-gal. Les cellules positives à la SA β-gal sont de couleur bleue et sont pointées par une flèche.

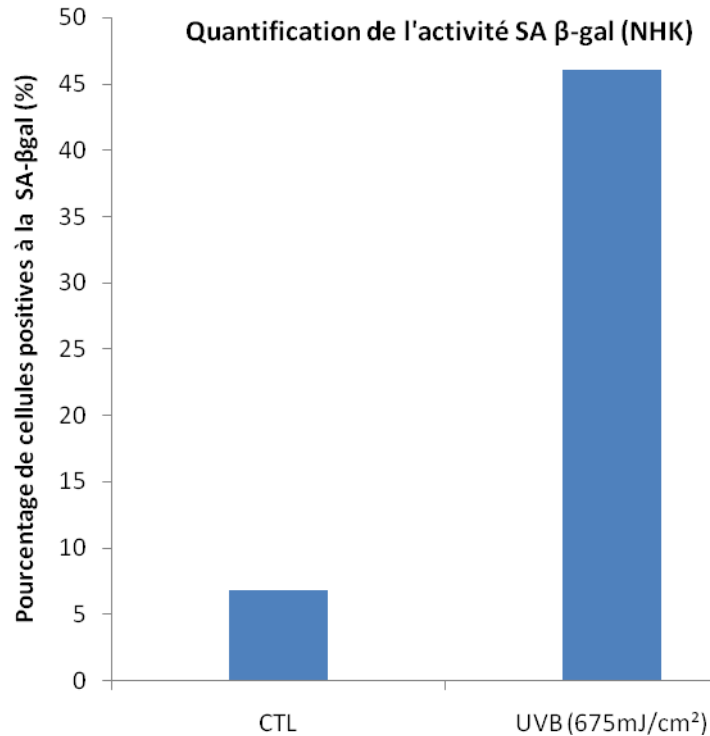


Figure 20 : Proportion de cellules NHK positives à la SA β-gal suite à 3 stress UVB à 675 mJ/cm² en comparaison avec des cellules NHK non exposées (CTL).

sont soumises à ces doses. Les résultats obtenus lors du test de survie cellulaire et du marquage de l'apoptose confirment que le modèle d'expositions aux UVB des NHK, soit 3 stress de 675 mJ/cm² répartis sur une journée, est bien subcytotoxique et n'induit pas d'apoptose.

3.2.3 Étude des marqueurs de la sénescence

3.2.3.1 L'activité SA β -gal

Afin d'observer l'apparition d'une sénescence prématurée chez les kératinocytes primaires suite à une exposition répétée aux UVB, nous avons réalisé un marquage de l'activité SA β -gal à 72 heures après le dernier stress UVB chez des cellules stressées et contrôles (Figure 19).

La quantification du comptage de cellules positives montrées en Figure 20, montre que la proportion de cellules positives à l'activité SA β -gal augmentent de 5 % dans les cellules contrôles à 46 % dans les cellules stressées aux UVB. On détecte donc, contrairement aux N-hTERT, une forte augmentation de la proportion de cellules positives à cette activité. Les UVB semblent donc induire une sénescence prématurée des NHK. Afin de vérifier cela, nous avons étudié si les NHK stressés arrêtaient de se diviser et exprimaient les gènes associés à la sénescence.

3.2.3.2 L'arrêt du cycle cellulaire

Afin de mettre en évidence l'arrêt du cycle cellulaire, nous avons mesuré les niveaux d'abondance relative d'ARNm et protéique de $p16^{INK-4a}$, $p21^{waf-1}$ et $p53$ à 72 h après le dernier stress.

En figure 21, nous observons une répression de l'abondance relative en ARNm de $p21^{waf-1}$ et de $p53$ de 1,4 x et de 1,2 x respectivement ainsi qu'une surexpression de $p16^{INK-4a}$. Cette surexpression de 2,7 x de $p16^{INK-4a}$ pourrait laisser supposer que les NHK exposés aux UVB arrêtaient de se diviser en surexprimant cette voie de contrôle du cycle cellulaire. Toutefois, il faut rester prudent face à l'interprétation de ces résultats, car, après test statistique, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative d'expression de ces trois gènes entre les cellules contrôles et les cellules stressées. Au niveau protéique, en Figure 22, nous détectons une augmentation d'abondance relative de la protéine $p21^{WAF-1}$, ainsi que de la protéine $p53$ et une légère augmentation de $p16^{INK-4a}$. Ces résultats semblent donc indiquer que les NHK exposés aux UVB surexpriment ces protéines intervenant dans l'arrêt du cycle cellulaire et ont donc probablement arrêté de proliférer.

Il serait intéressant de confirmer ces résultats en suivant l'incorporation de thymidine triciée chez les cellules contrôles et cellules stressées à différents temps après le dernier stress.

3.2.3.3 Modification de l'expression génique

Nous avons ensuite observé les variations d'expression au niveau de l'ARNm de plusieurs gènes impliqués dans la sénescence du kératinocyte.

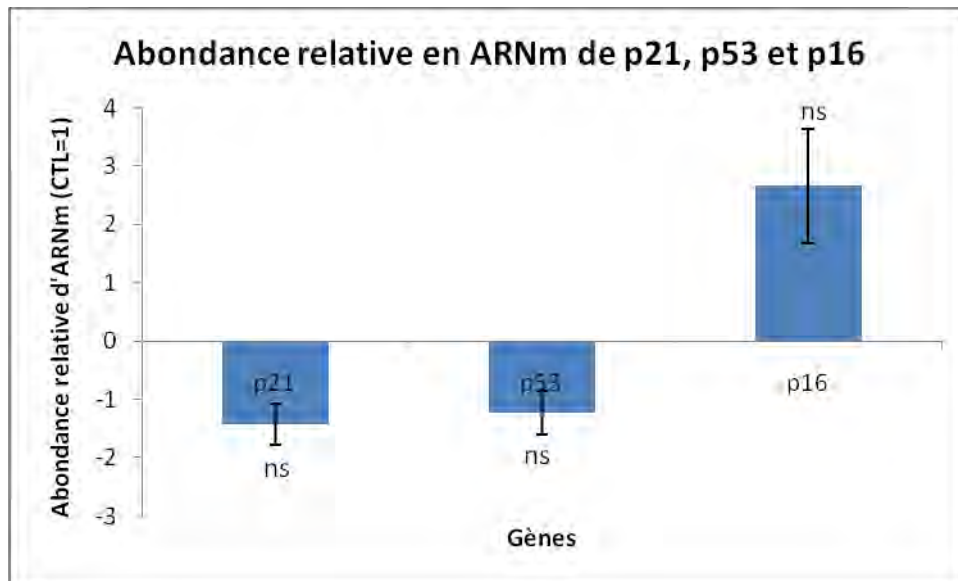


Figure 21 : Étude de l'abondance relative en ARNm de p21^{WAF-1}, p16^{INK-4a} et p53 chez les NHK après 3 expositions aux UVB à 675 mJ/cm². L'ARN a été extrait 72 h après le dernier stress et la PCR en temps réel a été réalisée. 23kDa a été choisi comme gène de référence lors de l'analyse des résultats. Les résultats (moyenne de triplicats +/- écart type) sont exprimés comme le rapport entre l'abondance relative de l'ARNm présent dans les cellules contrôles par rapport aux cellules stressées (CTL=1) (ns: non significatif).

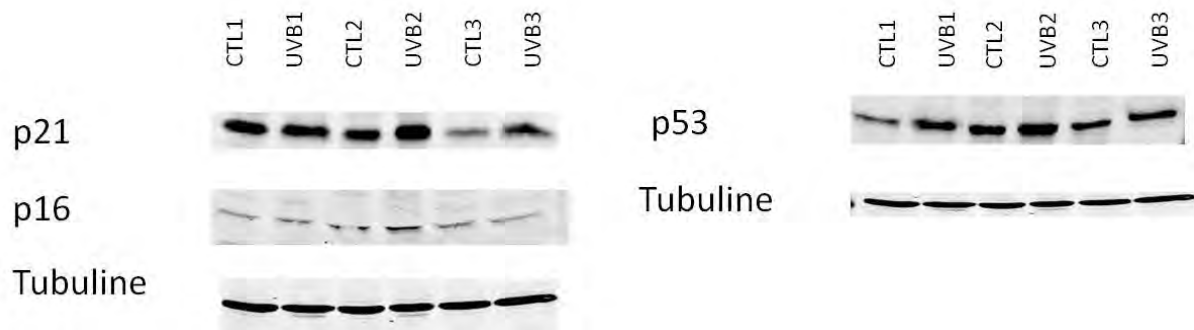


Figure 22 : Analyse de l'abondance relative des protéines p21^{WAF-1}, p16^{INK-4a} et p53 par Western blot. Les NHK ont été exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 expositions répétées d'UVB à 675 mJ/cm². Les protéines ont été extraites à 72 h après le dernier stress, dans 3 cultures indépendantes (notées 1 à 3). La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.

Comme montré en Figure 23, l'abondance relative des ARNm de *MMP9*, l'*ostéonectine*, *IGFBP-3*, *IGFBP-5*, *TGF-β1* et la *fibronectine* subissent chacun une surexpression significative de respectivement 32,1, 12,4, 2,2, 2,0, 2,4 et 59,3x chez les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles. Ces gènes ont été décrits par Kang et *al.* (Kang et al., 2003) pour être surexprimés chez les kératinocytes oraux normaux humains lors de la sénescence répllicative. Le fait que ces gènes soient surexprimés de manière significative et à des amplitudes plus importantes que chez les N-hTERT, semble confirmer que les NHK exposés aux UVB montrent une apparition prématurée de certains marqueurs de sénescence (SA β-gal, augmentation d'abondance protéique de *p21^{WAF-1}* et *p53*, et surexpression de gènes associés à la sénescence). Il semble donc que la réponse des NHK soit différente de celle des N-hTERT après expositions répétées aux UVB.

3.2.4 Étude des marqueurs de différenciation des kératinocytes

Après avoir mis en évidence chez les NHK l'apparition de marqueurs spécifiques de la sénescence suite à une exposition répétée aux UVB, nous avons voulu observer si des biomarqueurs de différenciation tardive étaient également présents dans ce modèle.

Pour cela, 72 heures après le dernier stress, nous avons analysé les niveaux d'abondance relative en ARNm et en protéines de l'involucrine, la filaggrine, la loricrine, K10 et K14.

3.2.4.1 Étude de l'abondance relative en ARNm de marqueurs de différenciation

Au niveau de l'ARNm, nous avons observé par PCR en temps réel l'abondance relative des ARNm codant pour les protéines involucrine, filaggrine, loricrine, k10 et k14.

Lorsqu'on observe les résultats obtenus en Figure 24, nous détectons et une surexpression significative de la loricrine et de K14 de respectivement 6,7 et 3,4 x chez les NHK stressés en comparaison avec les cellules contrôles. Les différences d'expression des autres gènes ne sont pas significatives.

3.2.4.2 Étude de l'abondance relative protéique de l'involucrine

Nous avons ensuite étudié l'abondance protéique de l'involucrine par Western blot à 72 heures après le dernier stress UVB. Les résultats en Figure 25 ne montrent aucune variation d'abondance de la protéine lorsque les cellules sont exposées aux UVB. Ces résultats confirment ceux obtenus au niveau de l'ARNm par PCR en temps réel où aucune modification d'expression n'a été observée.

3.2.4.3 Étude de l'abondance et de la localisation de marqueurs de différenciation tardive par immunofluorescence

Enfin, afin de comparer les deux modèles d'exposition, nous avons aussi voulu observer les modifications d'abondance et de localisation de l'involucrine et la filaggrine, par un marquage en immunofluorescence chez les NHK à 72 heures après le dernier stress UVB.

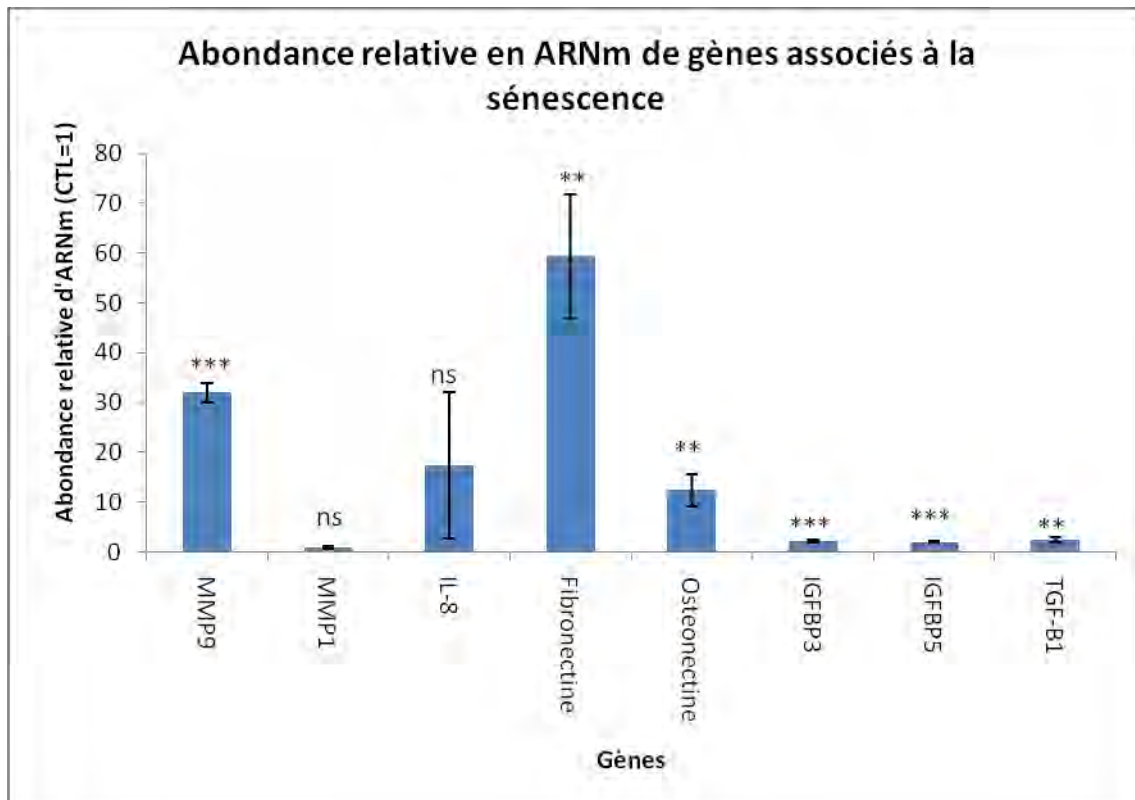


Figure 23 : Étude de l'abondance relative en ARNm de MMP9, MMP1, IL-8, fibronectine, ostéonectine, IGFBP3, IGFBP5 et TGF-β1 chez les NHK après 3 expositions aux UVB à 675 mJ/cm². L'ARN a été extrait 72 h après le dernier stress et la PCR en temps réel a été réalisée. 23kDa a été utilisé comme gène de référence lors de l'analyse des résultats. Les résultats (moyenne de triplicats +/- écart type) sont exprimés comme le rapport entre l'abondance relative de l'ARNm présent dans les cellules contrôles par rapport aux cellules stressées (CTL=1) (ns: non significatif, **: $P < 0.01$ et ***: $P < 0.001$).

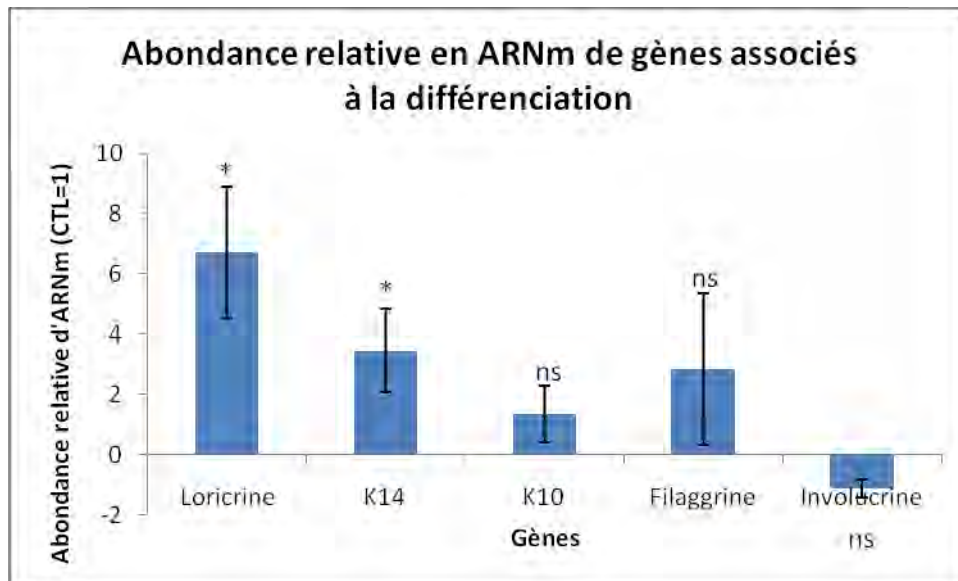


Figure 24 : Étude de l'abondance relative en ARNm de la filaggrine, loricrine, K14, K10 et involucrine chez les NHK après 3 expositions aux UVB à 675 mJ/cm². L'ARN a été extrait 72 h après le dernier stress et la PCR en temps réel a été réalisée. 23kDa a été utilisé comme gène de référence lors de l'analyse des résultats. Les résultats (moyenne de triplicats +/- écart type) sont exprimés comme le rapport entre l'abondance relative de l'ARNm présent dans les cellules contrôles par rapport aux cellules stressées (CTL=1) (ns: non significatif).

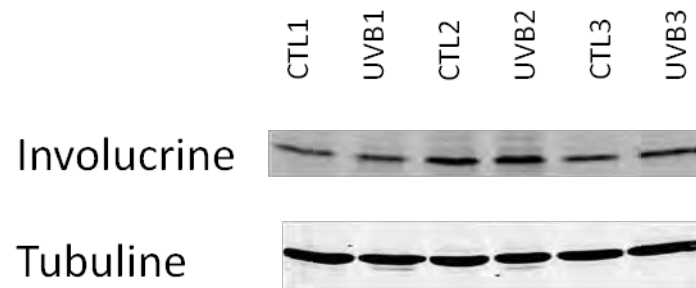


Figure 25 : Analyse de l'abondance relative de l'involucrine par Western blot. Les NHK ont été exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 expositions répétées d'UVB à 675 mJ/cm². Les protéines ont été extraites à 72 h après le dernier stress, dans 3 cultures indépendantes (notées 1 à 3). La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.

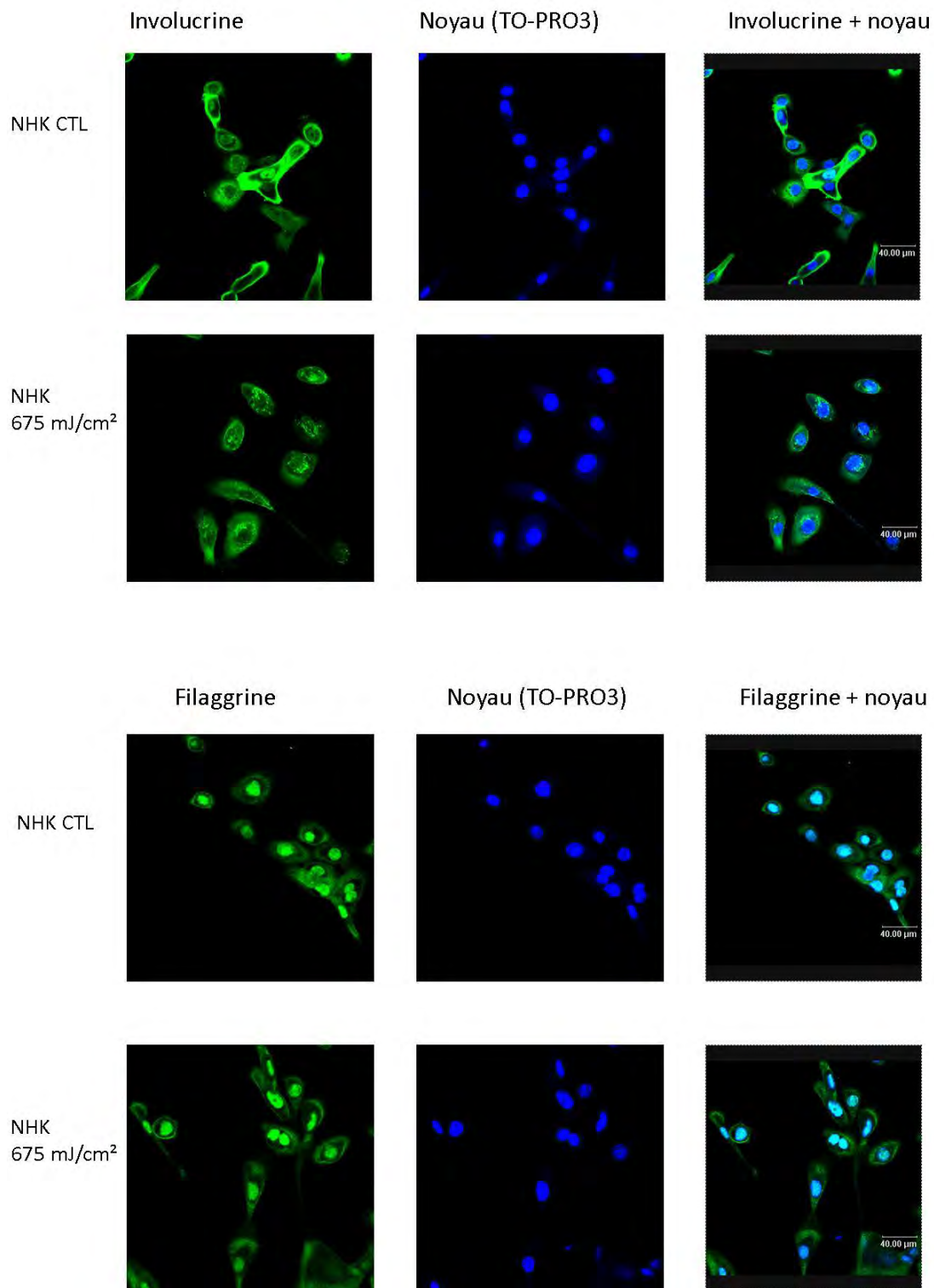


Figure 26 : Détection de l'involucrine et de la filaggrine par marquage en immunofluorescence chez les cellules NHK exposées à 3 stress répétés aux UVB. Ce marquage en immunofluorescence a été réalisé 72 h après la dernière exposition aux UVB. Les protéines ont été marquées avec un anticorps anti-filaggrine ou anti-involucrine et les noyaux avec du TO-PRO-3

La Figure 26 ne montre aucun changement ni d'abondance ni de localisation de ces protéines entre les cellules exposées aux UVB et les cellules contrôles.

Puisqu'aucune modification de l'expression de l'involucrine et de la filaggrine n'a été mise en évidence, on peut supposer qu'une exposition aux UVB n'induit aucune modification importante de l'état de différenciation des NHK.

3.2.5 Analyse de l'expression génique par cartes Microfluidiques TaqMan®

Les résultats obtenus jusqu'à présent, permettent de confirmer que les kératinocytes NHK soumis à des expositions répétées aux UVB entrent sénescence prématurée plutôt qu'en différenciation tardive. Afin de réaliser une description plus complète de ce modèle, nous avons décidé d'analyser les modifications d'expression génique en utilisant des cartes Microfluidiques TaqMan® (Applied Biosystems) identiques à celles utilisées avec les N-hTERT. Les résultats obtenus sur 3 cultures indépendantes après une analyse statistique sont montrés en Figure 27a pour les gènes surexprimés et en Figure 27b pour les gènes réprimés.

Après une analyse statistique (test t Student), nous avons identifié 9 gènes qui étaient surexprimés et 19 gènes réprimés chez les NHK stressés aux UVB.

Parmi les gènes surexprimés, on retrouve la *BCL2-associated X protein (BAX)* et la *cycline D1 (CCND1)* intervenant dans l'apoptose et dans l'arrêt du cycle cellulaire.

On retrouve également des gènes codant pour des protéines intervenant dans divers aspects du développement d'un épiderme comme la *defensine beta 1 (DEFB1)* qui est un peptide anti-microbique impliqué dans la résistance de l'épiderme à l'invasion microbienne. La *kératine 14 (KRT14)* qui intervient dans la formation du cytosquelette des kératinocytes. La *kératine 19 (KRT19)* qui est spécifiquement exprimée dans le périépiderme, l'enveloppe superficielle qui entoure l'épiderme en cours de développement. La *kératine 7 (KRT7)* qui est spécialement exprimée dans les épithéliums recouvrant l'intérieur des organes, des conduits glandulaires ou des vaisseaux sanguins.

Parmi les 19 gènes dont l'expression est réprimée, on retrouve des gènes impliqués dans l'inflammation et l'apoptose tels que (*Interleukin 1A et 1B*) *IL1A*, *IL1B* et *BCL2-like 1 (BCL2L1)* qui est une protéine de la famille des BCL-2.

On y retrouve également des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire avec la *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A ou p16^{INK-4a})*, qui est un gène générant plusieurs transcrits via un épissage alternatif. Le *growth arrest and DNA-damage-inducible alpha (GADD45A)* qui fait partie d'une famille de gènes qui subissent une augmentation du niveau de leur ARNm suivant un arrêt de la croissance suite à un stress et *TP53* (Abraham, 2001)

La matrice extracellulaire subit également un changement suite à la modification d'abondance des gènes comme *COL17A1*, le gène codant pour la *chaîne alpha 5 du collagène de type IV (COL4A5)* qui est l'une des six sous-unités du collagène IV, composant majeur de la membrane basale. La *fibuline 5 (FBLN5)* qui est une protéine de la matrice extracellulaire promouvant l'adhérence des cellules endothéliales. La *metalloprotéinase matricielle 1 (MMP1)*, qui dégrade le collagène de type I, II et III. La *metalloprotéinase matricielle 2*

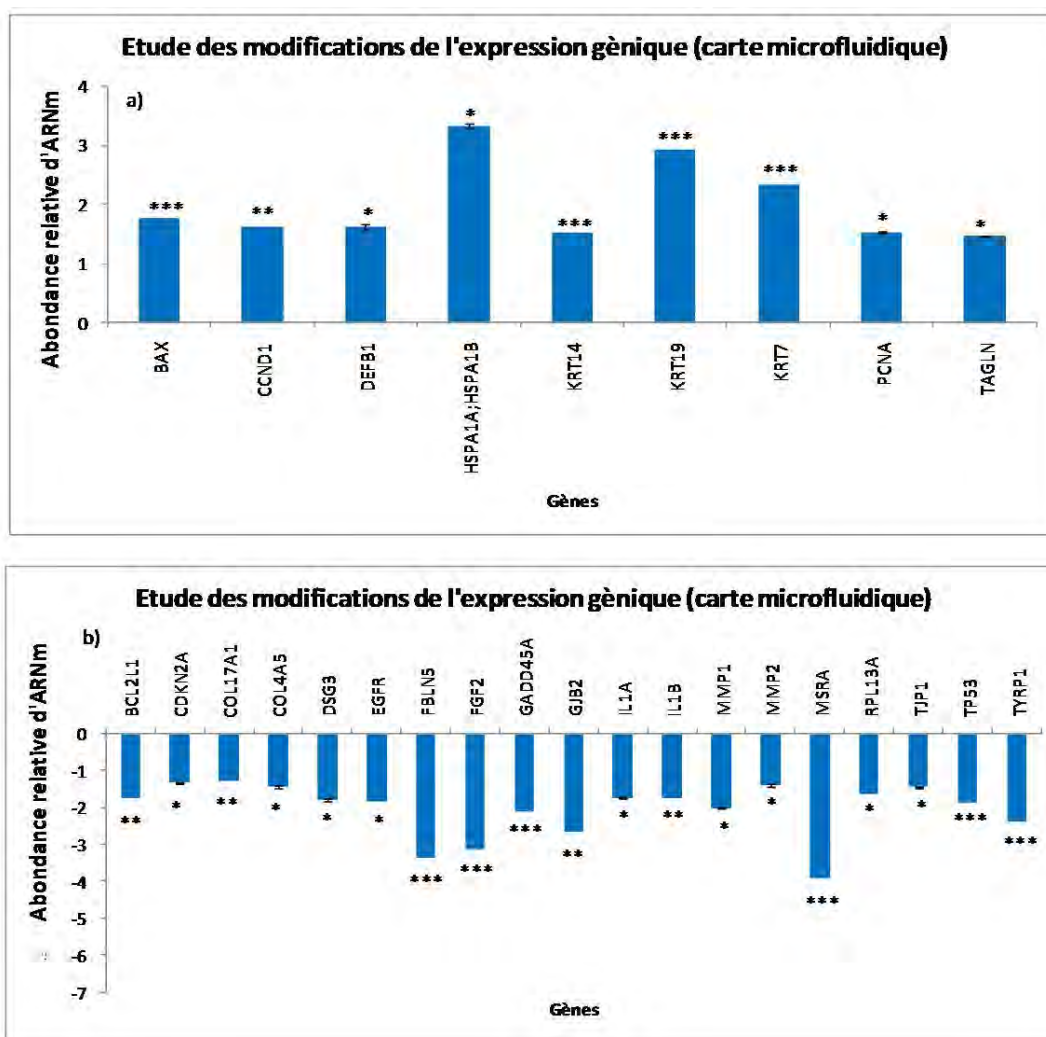


Figure 27 : Étude des modifications de l'expression génique par carte microfluidique TaqMan® sur des kératinocytes NHK après 3 expositions répétées aux UVB. L'ARN a été extrait à 72 heures après le dernier stress UVB et préalablement vérifié par l'Agilent 2100 Bioanalyzer. Le gène 18s a été utilisé comme gène de référence. La moyenne des résultats +/- écart type (N = 3) a été analysée par un test statistique (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ et ***: $P < 0.001$). Les gènes dont l'abondance relative en ARNm est surexprimée (a) et réprimée (b) chez les cellules stressées sont exprimés par rapport aux cellules contrôles.

	p53	MMP1	GADD45A	PCNA	HSPA1A	KRT14
PCR en temps réel	-1,66	-1,08	-1,55	1,52	3,28	3,45
Carte microfluidique	-1,85	-3,23	-2,11	1,53	3,33	1,15

Figure 28 : Confirmation par PCR en temps réel des résultats obtenus par carte microfluidique TaqMan®. 6 gènes possédant une variation d'expression dans les cartes Micro Fluidic TaqMan® ont été analysés par PCR en temps réel avec utilisation du SYBR Green en utilisant 23kDa comme gène de référence.

(*MMP2*) quant à elle, dégrade le collagène de type IV. La modification d'abondance de gènes impliqués dans la formation et l'entretien de la matrice extracellulaire laisse supposer leur implication dans le changement de morphologie que subissent les kératinocytes en entrant en sénescence. Enfin, notons que lorsqu'on regarde cette liste de gènes on ne détecte pas de modification d'expression de gènes impliqués dans le processus de différenciation tardive.

3.2.6 Confirmation de l'analyse des cartes microfluidiques par PCR en temps réel

Dans le but de confirmer les résultats obtenus par les cartes microfluidiques TaqMan®, nous avons réalisé plusieurs contrôles par PCR en temps réel utilisant le SYBR Green comme agent intercalant. Nous avons sélectionné 6 gènes qui étaient exprimés différemment dans les cellules exposées aux UVB sur les cartes microfluidiques. Les résultats obtenus (Figure 28) montrent que, les valeurs obtenues pour chacun des gènes varient de manières similaires dans les deux techniques utilisées. Nous confirmons la surexpression des gènes *kératine 14*, *PCNA* ou *HSPA1A*, ainsi que la répression des gènes *p53*, *MMP1*, et *GADD45A* dans des ordres de grandeur similaires, quelque soit la technique utilisée. Ces résultats confirment donc les résultats obtenus par carte microfluidique. Les résultats obtenus sur les deux modèles d'expositions UVB répétées semblent montrer que les N-hTERT exposés aux UVB entrent en différenciation tardive tandis que les NHK entrent en sénescence prématurée.

3.3 Variation transcriptomique au cours du photovieillissement

Afin de comparer ces deux modèles avec ce qui se passe lors du photovieillissement de la peau, nous avons décidé de réaliser une analyse des modifications d'expression génique du photovieillissement de la peau en utilisant les cartes microfluidiques TaqMan® (Applied Biosystems) et de comparer les résultats obtenus sur les deux modèles. Pour ce faire, nous avons récolté des échantillons de peau provenant de donneurs jeunes et âgés. Les échantillons de peau ont été isolés à partir de prépuces de jeunes donneurs (N = 6, âge moyen = 18 mois +/- 9 mois), ou de paupières provenant de donneurs plus âgés (N = 6, âge moyen = 73 ans +/- 15 ans). Les échantillons provenant des donneurs plus âgés sont considérés comme photoâgés puisqu'ils sont localisés sur une partie du corps qui est exposée aux UV. Après une séparation de l'épiderme par un traitement à la dispase, nous avons extrait l'ARN et observé les variations d'expression génique en utilisant des cartes microfluidiques TaqMan® (Applied Biosystems) réalisées sur demande, et permettant l'étude simultanée de l'expression de 92 gènes impliqués dans la physiologie de la peau (Annexe1) ainsi que 4 gènes de références. Les résultats obtenus avec les cartes Microfluidiques TaqMan® après une analyse statistique (test t de Student) sont montrés en figure 29a pour les gènes surexprimés et en figure 29b pour les gènes réprimés.

3.3.1 Analyse de l'expression génique par cartes Microfluidiques TaqMan®

Comme précédemment, l'intégrité des échantillons d'ARN a été vérifiée en utilisant l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Parmi les gènes subissant une variation, certains d'entre eux sont impliqués dans le vieillissement de la peau comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la réorganisation de la matrice extra

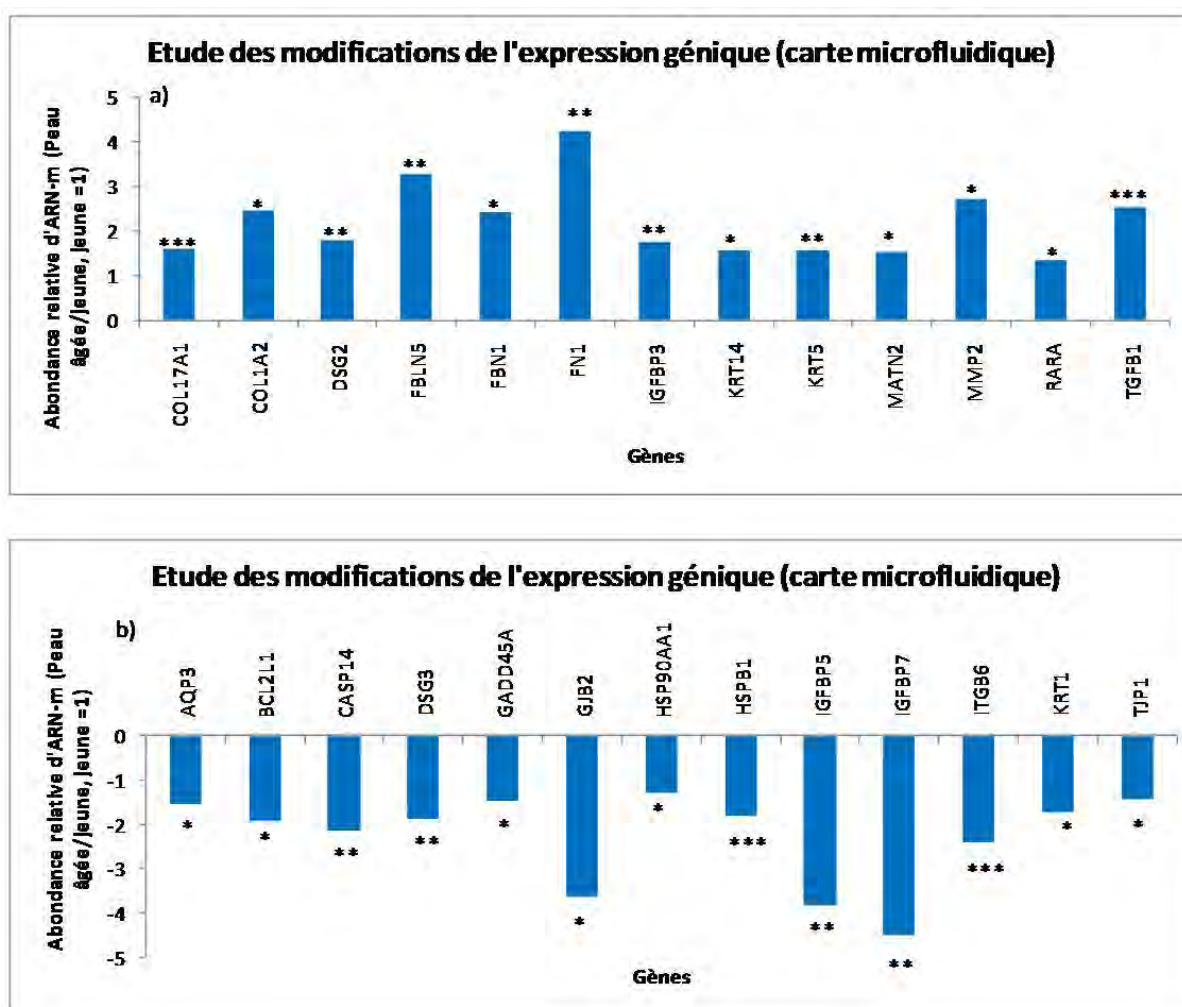


Figure 29 : Étude des modifications de l'expression génique par carte microfluidique TaqMan® sur des échantillons de peau âgée en comparaison avec des échantillons de peau jeune. L'ARN a été préalablement vérifié par l'Agilent 2100 Bioanalyzer. Le gène 18s a été utilisé comme gène de référence. La moyenne des résultats +/- écart type (N = 6) a été analysée par un test statistique (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ et ***: $P < 0.001$). Les gènes dont l'abondance relative en ARNm est surexprimée (a) et réprimée (b) chez les échantillons de peau âgée sont exprimés par rapport aux échantillons de peau jeune.

	Fibronectin	TGFB-1	IGFBP3	IGFBP5	GADD45A
PCR en temps réel	4,43	3,64	2,89	-3,07	-1,82
Carte microfluidique	4,25	2,55	1,76	-3,84	-1,48

Figure 30 : Confirmation par PCR en temps réel des résultats obtenus par carte microfluidique TaqMan®. 5 gènes possédant une variation d'expression dans les cartes Micro Fluidic TaqMan® ont été analysés par PCR en temps réel avec utilisation du SYBR Green en utilisant 23kDa comme gène de référence.

cellulaire. Sur cette carte, les 13 gènes repris sur la figure 29a sont surexprimés. On y retrouve des gènes impliqués dans la régulation de la matrice extracellulaire comme *COL17A1*, *COL1A2*, *FBLN5*, *FBNI*, *FNI*, *MMP2*. La surexpression de ces gènes confirme la modification de la matrice extracellulaire de la peau lorsque celle-ci est exposée chroniquement aux UVB.

On y retrouve également l'*IGFBP3* et le *TGFBI* qui sont impliqués dans la sénescence et pour finir, deux kératines sont surexprimées avec la *KRT14* et la *KRT 5* qui est une kératine spécifique de la couche basale.

Nous avons également détecté 13 gènes qui sont réprimés. On y retrouve (Figure 29b) des gènes impliqués dans l'apoptose avec la présence de *BCL2L1*, *CASP14* et pour finir, l'*insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7)*, *IGFBP5*, *GADD45A* et *KRT1*.

Le fait que des gènes impliqués dans la structure de la matrice sont exprimés (*COL17A1*, *COL1A2*, *FBLN5*, *FBNI*, *FNI*, *MATN2* et *MMP2*) confirme le fait que la matrice extracellulaire subit des changements au cours du photovieillissement. On peut supposer que la peau peut avoir développé une réponse adaptative aux expositions chroniques aux UVB. À côté de cela, la présence de protéine de réponse aux stress et d'apoptose met en évidence les mécanismes de protection visant à protéger les protéines ou l'intégrité du tissu en évitant la propagation de cellules trop endommagées.

3.3.2 Confirmation de l'analyse des cartes Microfluidiques par Real-Time PCR

Une nouvelle fois, nous avons réalisé plusieurs contrôles par PCR en temps réel utilisant le SYBR Green comme agent intercalant afin de confirmer les résultats obtenus par les cartes microfluidiques TaqMan®. Nous avons sélectionné 5 gènes qui étaient exprimés différemment dans les peaux photoâgées dans les cartes microfluidiques. Les résultats obtenus (Figure 30) montrent que, les valeurs obtenues pour chacun des gènes varient de manières similaires dans les deux techniques utilisées. Nous confirmons la surexpression des gènes *fibronectine*, *IGFBP3* ou *TGFβ-1* ainsi que la répression des gènes *IGFBP5* et *GADD45A* dans des ordres de grandeur similaires, quelque soit la technique utilisée. Ces résultats confirment donc les résultats obtenus par carte microfluidique.

4. Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons comparé et caractérisé la réponse à long terme de kératinocytes immortalisés (N-hTERT) et normaux (NHK) à des expositions répétées d'UVB.

Les kératinocytes sont caractérisés par une différenciation leur permettant de développer les différentes couches successives de l'épiderme. Les différents stades de différenciation sont caractérisés par des marqueurs protéiques spécifiques (Candi et al., 2005). D'autre part, les kératinocytes en culture développent, après une dizaine de doublements de population, des marqueurs de sénescence répllicative (Gosselin et al., 2009).

Au laboratoire, il a été montré que les fibroblastes humains de poumon et de peau pouvaient entrer en sénescence prématurée suite à des expositions répétées d'agents oxydatifs (*t*-BHP, H₂O₂ (Dumont et al., 2000) et/ou entraînant des dommages à l'ADN (UVB (Debacq-Chainiaux et al., 2005)). Nous nous sommes donc intéressés à la réponse de kératinocytes immortalisés ou normaux aux expositions répétées d'UVB afin de déterminer si ces stress induisaient une différenciation ou une sénescence prématurée.

Le modèle utilisé sur les kératinocytes N-hTERT ne possédant pas de gène p16^{INK-4a} fonctionnel et immortalisés par l'expression de la télomérase humaine (hTERT) a été mis au point précédemment au laboratoire et induit l'apparition d'une différenciation alternative prématurée (Bertrand-Vallery et al., 2009). Notons que des études réalisées précédemment ont permis de démontrer que l'expression de la télomérase seule ne suffisait pas à empêcher les kératinocytes d'entrer en sénescence, mais qu'il fallait en plus inhiber le gène p16^{INK-4a} qui est un inhibiteur de CDK et qui peut stopper le cycle cellulaire en phase G1/S (Rheinwald et al., 2002).

Le modèle utilisé sur les kératinocytes NHK a lui aussi été mis au point au laboratoire, en collaboration avec le laboratoire de Dermatologie de la KULeuven (Prof. M. Garmyn). Des premières observations réalisées sur ce modèle semble montrer que les NHK, contrairement aux N-hTERT, développeraient des marqueurs de sénescence prématurée après stress UVB.

Ces deux modèles suivent un protocole d'exposition UVB différent qui a été mis au point pour chacune des lignées utilisées afin d'être subcytotoxique et de n'induire aucune apoptose. Le modèle d'exposition des N-hTERT est composé de 8 stress de 300 mJ/cm², répartis sur deux jours. Le modèle sur NHK est quant à lui composé de 3 stress de 675 mJ/cm², sur une seule journée.

La première partie de notre travail a consisté en la vérification que les doses choisies étaient subcytotoxiques et n'induisaient aucune apoptose. Lorsque nous avons comparé la différence qu'il existait entre les deux modèles, nous avons observé que les N-hTERT supportaient bien les expositions multiples sous une dose réduite, mais que si on augmentait la dose en réduisant le nombre d'expositions, leur tolérance diminuait. Le phénomène inverse a quant à lui été observé sur les NHK ne supportant pas les 8 doses à 300 mJ/cm², mais supportant les 3 doses à 675 mJ/cm². Il semble donc que les N-hTERT supportent bien un nombre plus élevé de stress, tandis que les NHK sont plus résistants à la puissance utilisée. L'étude de l'induction de l'apoptose par marquage en immunofluorescence de la caspase 3 active a confirmé que les doses choisies n'induisaient pas l'apoptose des cellules.

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des marqueurs de sénescence et de différenciation développés dans les deux modèles. Au niveau

des marqueurs de sénescence, nous nous sommes intéressés à l'activité SA β -galactosidase (SA β -gal) détectée chez les kératinocytes sénescents (Gosselin et al., 2009), à l'arrêt des divisions cellulaires en mesurant l'expression d'acteurs clefs de l'arrêt du cycle cellulaire tels que p21^{WAF-1}, p16^{INK-4A} et p53 et à l'expression de gènes associés à la sénescence (Kang et al., 2003). En ce qui concerne les marqueurs de différenciation, nous avons étudié l'expression de marqueurs de différenciation précoce (kératine 10 et 14) et tardive (involucrine et filaggrine) des kératinocytes.

Les résultats que nous avons obtenus dans le modèle de stress UVB sur N-hTERT confirment les observations faites par V. Bertrand-Vallery qui a montré que les N-hTERT exposés aux UVB développaient une différenciation tardive alternative caractérisée par une augmentation de l'abondance de l'involucrine, de la filaggrine, et une surexpression de MMP-9 (Bertrand-Vallery et al., 2010a). Au niveau des marqueurs de sénescence, nous n'avons pas observé de modification importante de l'activité SA β -gal, ni de modification de l'expression de p53. Nous avons observé une légère surexpression de p21^{WAF-1}, en accord avec les résultats obtenus par V. Bertrand-Vallery. L'activation de p21^{WAF-1} est dépendante de p53 qui se lie au promoteur du gène p21^{WAF-1} et active ainsi sa transcription (Johnson and Walker, 1999). Il est possible qu'au moment où nous avons réalisé nos extractions, c'est-à-dire à 72 heures après le dernier stress, nous ne détectons plus de modification d'expression de p53, sans doute activé avant, mais qu'on détecte toujours une surexpression de p21^{WAF-1}. En effet, V. Bertrand-Vallery a montré que l'abondance relative protéique de p53 était surtout détectable à 16h et à 40h après le dernier stress (Bertrand-Vallery et al., 2009). Il serait donc intéressant de réaliser une cinétique d'extractions après le dernier stress pour confirmer ces résultats. De plus, il serait également instructif de corrélérer ces résultats avec un test d'incorporation de thymidine tritiée. En ce qui concerne l'expression de gènes associés à la sénescence, nous avons mis en évidence la surexpression de la *fibronectine*, constituant de la matrice extracellulaire, ainsi que des gènes *MMP-1* et *MMP-9*, codant pour les métalloprotéinases matricielles MMP-1 (collagénase) et MMP-9 (92-kD gélatinase). Ces métalloprotéinases sont dépendantes de l'activation de AP-1 (Activator Protein 1) qui est un facteur de transcription composé des protéines Fos et Jun, activé après expositions UVB et lors du photovieillissement de la peau (Fisher et al., 2002). Les UVB vont également induire l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui va à son tour stimuler la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires parmi lesquelles on retrouve TNF- α et IL-8 (Senftleben and Karin, 2002). Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence de surexpression de l'*IGFBP-3* et du *TGF- β 1*, décrits pour être surexprimés lors de la sénescence des kératinocytes (Kang et al., 2003) chez les N-hTERT exposés aux UVB. Ces résultats semblent donc confirmer que les N-hTERT exposés aux UVB entrent dans un état de différenciation tardive alternative plutôt qu'en sénescence prématurée.

Nous avons également étudié ces marqueurs de sénescence et de différenciation dans le modèle d'expositions répétées des NHK aux UVB, mis récemment au point au laboratoire. En ce qui concerne les marqueurs de différenciation, nous n'avons pas pu mettre en évidence de modification de l'expression des marqueurs de différenciation. Ainsi, au contraire des N-hTERT, nous n'avons pas détecté de modification de l'abondance de l'involucrine et de la filaggrine. Par contre, en ce qui concerne les marqueurs de sénescence, nous avons montré une forte augmentation de la proportion de cellules positives à la SA β -gal chez les NHK exposés aux UVB atteignant ainsi 46 % de cellules positives après expositions UVB, en comparaison avec les 10 % de cellules positives atteint chez les N-hTERT. Au niveau de l'arrêt du cycle cellulaire, nous avons mis en évidence une augmentation de l'abondance protéique relative de p21^{WAF-1} et de p53, ainsi qu'une plus légère augmentation de p16^{INK-4A}, à

72 heures après le dernier stress, ce qui laisse supposer que les cellules ont sans doute arrêté de proliférer. Il serait intéressant de compléter ces résultats par une étude de l'incorporation de thymidine tritiée, afin de confirmer l'arrêt de prolifération. Pour ce qui est des gènes associés à la sénescence, nous avons observé une forte surexpression de la *fibronectine* et de l'*ostéonectine*, deux composants de la matrice extracellulaire, ainsi qu'une surexpression de *MMP-9*. Le *TGF-β1* ainsi que l'*IGFBP-3* sont également surexprimés. L'ensemble de ces résultats semblent donc confirmer que les NHK exposés aux UVB entrent en sénescence prématurée et non en différenciation tardive alternative.

Notons que comme nous l'avons déjà mentionné, l'expression de la télomérase à elle seule ne suffit pas à immortaliser les kératinocytes. En effet, les kératinocytes oraux normaux humains développent après plusieurs passages en culture les différents marqueurs de la sénescence (Kang et al., 2003). Il semble donc que l'inactivation du gène *p16^{INK-4A}* soit essentielle pour leur immortalisation, sans toutefois modifier leur capacité de différenciation (Dickson et al., 2000). Il a été montré que la surexpression de *p16^{INK-4A}* était un excellent marqueur de vieillissement de la peau *in vivo* (Ressler et al., 2006). Afin de confirmer l'implication de ce gène dans l'apparition de la sénescence, il serait intéressant de tester l'effet de stress UVB répétés chez des kératinocytes normaux dans lesquels l'expression de *p16^{INK-4A}* est inhibée, par exemple, en utilisant des siRNA.

Afin de réaliser une étude des modifications de l'expression génique plus complète, nous avons utilisé des cartes microfluidiques (Applied Biosystems), créées sur demande, et permettant l'analyse de l'expression de 92 gènes associés à la physiologie de la peau et de 4 gènes de référence. Les résultats obtenus ont été confirmés par PCR en temps réel « classique » utilisant le SYBR Green comme agent intercalant.

Lors du modèle d'expositions répétées d'UVB sur N-hTERT, nous avons observé des modifications d'expression de **gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire**. Ainsi, nous avons montré une surexpression de *COL17A1*, de *COL1A2* ainsi qu'une répression de *COL3A1*. Ces trois gènes codent pour différents types de collagènes présents dans la matrice extracellulaire. D'autre part, nous avons également détecté une surexpression de la *fibronectine* (*FN1*) et de la *fibriline-1* (*FBN1*) mais une répression de l'*ostéonectine* (*SPARC*), codant également pour trois autres protéines de la matrice extracellulaire. Une surexpression de *MMP-9* est également détectée.

Lors du modèle sur NHK, nous avons également remarqué des modifications de l'expression de gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire. Nous avons ainsi mis en évidence une répression de *COL17A1*, *COL4A5*, *MMP-1* et *MMP-2*.

In vivo, la peau humaine, comme les autres organes, subit un vieillissement intrinsèque, principalement déterminé génétiquement. En plus de cela, la peau est directement en contact avec l'environnement et par conséquent, subit un vieillissement extrinsèque qui est le résultat de dommages environnementaux, et plus particulièrement des UV, et de ce fait également dénommé photovieillissement. L'une des principales cibles du vieillissement de la peau sont des réarrangements au niveau de la matrice extracellulaire avec pour conséquence une diminution de la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire et une augmentation de l'expression des métalloprotéinases (MMP), enzymes responsables de la dégradation des différents constituants de la matrice extracellulaire (Sternlicht and Werb, 2001). Ceci entraîne des modifications importantes de la composition de cette dernière

(Fisher et al., 2002; Wlaschek et al., 2001). Il a été montré que les UVB activent des récepteurs de cytokines et de facteurs de croissance à la surface des kératinocytes. Une fois activés, ces récepteurs stimulent des cascades de transduction du signal qui à leur tour, stimule la transcription de gènes de MMP (Angel et al., 2001). Un facteur de transcription important dans la régulation de l'expression de ces MMP est le facteur AP-1. Des kinases activées après un stress UVB activent le facteur de transcription AP-1 qui induit la transcription d'un grand nombre de gènes intervenants dans des fonctions diverses comme la prolifération cellulaire ou la différenciation. AP-1 peut également être activé par plusieurs oxydants, ce qui fait de AP-1 un facteur de transcription efficace contre le stress oxydatif (Lavrovsky et al., 2000). Parmi les gènes activés par AP-1, on retrouve des gènes codant les MMP (Angel et al., 2001). Dans la peau, les MMP sont constitutivement exprimées ce qui entraîne un équilibre entre synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire. Mais ces MMP seront surexprimées en cas d'exposition aux UV via AP-1. Les MMP-1 vont dégrader le collagène de type I et III de la peau en le clivant à un site précis de la triple hélice, ce qui va réduire l'intégrité structurelle du derme. Une fois clivé par MMP-1, le collagène subira une nouvelle dégradation via l'action de MMP-3 et MMP-9 (Sternlicht and Werb, 2001). *In vivo*, il a été montré que l'activité de MMP-3 et MMP-9 était identique (Fisher and Voorhees, 1998). Sans une réparation efficace des dommages induits par les MMP sur le collagène, un phénomène d'accumulation apparaîtra à chaque exposition successive aux UVB, induisant une accumulation des composants de la matrice extracellulaire dégradés générant un photovieillissement de la peau (Fisher et al., 2002).

Une exposition solaire chronique aura également comme conséquence un épaissement de l'épiderme et de la couche cornée. La fonction de cet épaissement est une mesure de protection visant à augmenter le chemin que devront parcourir les UV avant d'atteindre les couches inférieures de la peau telle que la couche basale ou suprabasale, qui sont plus vulnérables aux UV (de Winter et al., 2001). Une autre protection développée par la peau pour lutter contre les dommages induits par les expositions chroniques est une augmentation de la pigmentation via la production de mélanine (Verschooten et al., 2006). Cette protection est basée sur une augmentation de la taille et du nombre de mélanocytes. La mélanine sera stockée dans les mélanosomes qui formeront une protection par-dessus les noyaux des kératinocytes et les protégeront de dommages induits par les UVB (Kanitakis, 2002). Il a été montré que les dommages à l'ADN induits par les UV ou leurs réparations pouvaient stimuler l'apparition d'une pigmentation (Gilchrest and Eller, 1999). Puisque les dommages à l'ADN induisent l'expression de p53, il est supposé que p53 pourrait avoir un rôle dans l'induction de la pigmentation suite à une exposition aux UV (Nylander et al., 2000).

En ce qui concerne les **gènes codant pour des marqueurs de différenciation**, nous avons observé dans le modèle N-hTERT une répression de *KRT1* et *KRT10*, qui sont des marqueurs de différenciation précoce des kératinocytes, ce qui confirme une modification de l'état de différenciation des N-hTERT exposés aux UVB.

Pour ce qui est des **gènes codant des protéines impliquées dans l'inflammation**, nous remarquons une surexpression de l'*IL-1β* et de l'*IL-8* chez les cellules N-hTERT exposées aux UVB, tandis que nous observons une répression des gènes *IL-1α* et *IL-1β* chez les NHK exposées aux UVB. Il semble donc que les N-hTERT exposées aux UVB soient exposées à de l'inflammation. Il serait intéressant de confirmer cela en réalisant des dosages de la sécrétion des différentes cytokines inflammatoires par ELISA.

Des modifications d'expression de **gènes codant pour des récepteurs de facteurs de croissance** ont également été identifiées. Chez les N-hTERT, nous observons une surexpression du récepteur de l'insulin-like growth factor 1 (IGF-1R). Il a été montré que la sénescence induite par les UVB nécessitait p53 ainsi qu'un récepteur fonctionnel à l'IGF (Fisher et al., 2002). Lorsque les kératinocytes primaires sont exposés aux UVB, la liaison entre l'IGF-1R et son ligand protège les kératinocytes d'une apoptose induite par les UVB. En contrepartie, les kératinocytes sont dans l'incapacité de proliférer (Lewis et al., 2008). Cette réponse aux UVB permet de maintenir la fonction protectrice de l'épiderme tout en évitant que des kératinocytes possédant des mutations induites par les UVB ne se répliquent. Le même mécanisme est donc peut-être activé chez les N-hTERT exposés aux UVB. De plus, nous observons une répression de l'*IGFBP-3* et de l'*IGFBP-5* (*Insulin-like growth factor binding protein-3 et -5*). Les protéines IGFBP-3 et IGFBP-5 sont capables de lier l'IGF et de moduler son activation. Il serait donc intéressant de s'intéresser à la voie de signalisation de l'IGF chez les N-hTERT exposés aux UVB.

Nous avons également mis en évidence que le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) était réprimé chez les NHK ayant subi une exposition aux UVB. Le facteur EGF augmente l'activité de liaison à l'ADN de AP-1 qui est un important facteur de transcription pour la prolifération cellulaire (Shi and Isseroff, 2005). Au cours du vieillissement des kératinocytes, l'activité de liaison de AP-1 montre certains changements. De plus, lors du vieillissement, la voie des MAP kinases ne fonctionne plus correctement, influençant de ce fait la transmission de l'EGF vers le noyau.

Au niveau des **gènes codant pour des protéines de réparation aux stress**, nous avons identifié une répression de la *MSRA* (*Methionine Sulfoxide Reductase A*), codant pour une enzyme anti-oxydante, chez les N-hTERT. Chez les NHK, nous avons identifié une surexpression de *PCNA* (*Proliférating Cell Nuclear Antigen*) qui code pour une protéine nucléaire intervenant dans la réparation de l'ADN, sa réplication et sa recombinaison (Moore et al., 2004) après expositions répétées aux UVB. Une exposition aux UVB induit des dommages qui s'ils ne sont pas réparés correctement, mène à un photovieillissement ou au développement de cancers (Brash et al., 1996). PCNA joue un rôle critique dans le mécanisme de réparation à l'ADN appelé NER (Nucleotide Excision Repair) et par la même occasion, agit dans la réparation des dommages induits par les UVB. Par conséquent, PCNA est un bon marqueur de réparation de l'ADN dans la peau et un indicateur indirect des photodommages induits par les UV sur l'ADN (Moore et al., 2004). En ce qui concerne les NHK exposés aux UVB, nous avons par contre observé une répression de *GADD45A* (Growth Arrest and DNA-Damage-inducible 45 alpha). *GADD45A* est une protéine multifonctionnelle qui est régulée par p53 et qui est impliquée dans l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Hildesheim et al., 2002). Ce gène est un membre d'une famille de gènes dont les protéines agissent en amont ou en aval de la cascade des MAPK kinases. *GADD45a* est une protéine intéressante, car elle est capable de se lier avec p21^{waf-1} (arrêt du cycle cellulaire) ou PCNA (Chen et al., 1995).

Notons que nous avons détecté peu de changements d'expression génique communs dans les deux modèles. Ainsi, nous observons une surexpression de *HSPA1A* ; *HSPA1B* à la fois chez les N-hTERT et chez les NHK exposés aux UVB. L'expression de ces protéines de chocs est probablement une réponse au stress. Nous observons également une surexpression de *Bax* et de *CCND1* ainsi qu'une répression de *GJB2* et de *p53* dans les deux modèles. Le peu de gènes communs est en accord avec le fait que les deux types cellulaires répondent différemment aux expositions répétées d'UVB.

En ce qui concerne l'étude de l'expression génique lors du photovieillissement de la peau, nous retrouvons des modifications d'expression commune avec les deux modèles. Ainsi lorsque nous comparons les résultats obtenus lors du photovieillissement de la peau et dans le modèle d'expositions répétées sur N-hTERT, nous retrouvons une surexpression de *COL17A1*, de *FNI* et une répression de *AQP3*, *CASP14*, *GJB2* et *IGFBP5*. Lorsque nous faisons le même exercice avec les résultats obtenus lors du modèle d'expositions répétées sur NHK, nous retrouvons une surexpression de *KRT14*, et une répression de *BCL2L1*, *GADD45A*, *GJB2* et *TJP1*. Notons également que nous observons lors du photovieillissement de la peau une surexpression du *TGF-β1*. Nous avons également mis en évidence une surexpression du *TGF-β1* par PCR en temps réel classique utilisant le SYBR Green comme agent intercalant chez les NHK exposés aux UVB. Ce gène est particulièrement intéressant, car il a été montré que le *TGF-β1* était impliqué dans l'apparition du phénotype sénescence dans différents modèles de sénescence prématurée induite par les stress chez les fibroblastes humains (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Debacq-Chainiaux et al., 2008; Dumont et al., 2000; Fripiat et al., 2001). Il est donc particulièrement intéressant d'avoir mis en évidence une surexpression du TGF-β1 dans le modèle sur NHK et lors du photovieillissement. Afin de confirmer si le TGF-β1 intervient également dans l'apparition des biomarqueurs de sénescence chez les NHK exposés aux UVB, il serait intéressant d'étudier son niveau protéique par immunofluorescence, d'analyser si la voie de signalisation typique du TGF-β1 et faisant intervenir les protéines Smads est activée et enfin d'étudier l'impact de l'inhibition du TGF-β1 par l'utilisation d'anticorps neutralisants ou de siRNA spécifique.

En conclusion, nous pouvons dire que lorsque les kératinocytes sont exposés à de faibles doses d'UVB, ils possèdent des mécanismes de défense qui leur permettent de réparer les dégâts occasionnés, de conserver l'intégrité de leur ADN et de continuer à exercer normalement leur fonction protectrice. En revanche, lorsque l'exposition aux UVB se fait à une dose trop importante, les dommages à l'ADN résultant sont trop importants pour pouvoir être réparés correctement, déclenchant les mécanismes de défense que sont l'apoptose ou la sénescence. L'apoptose est une mort cellulaire programmée évitant la réplication des cellules ayant subi trop de mutations, et ce, afin d'éviter une transformation maligne des kératinocytes. La sénescence cellulaire est le second mécanisme de défense contre les UVB, mais qui se situe à mi-chemin entre la survie et la mort cellulaire. La sénescence intervient lorsque les dommages sont trop étendus pour être réparés complètement et induit un arrêt du cycle cellulaire des kératinocytes.

Au niveau de la peau, bien que les rayons UV soient une grande source de dommages pour les différents constituants cellulaires des kératinocytes, il existe une large gamme de mécanismes qui permettent de maintenir l'intégrité de l'épiderme. Ceci permet à la peau de contrôler l'apparition de cellules cancéreuses tout en conservant sa fonction protectrice pour les organes internes. Cependant, les expositions répétées aux UV vont induire des dommages qui s'accumuleront avec l'âge. Les dommages et modifications de la matrice extracellulaire que produise chacune des expositions vont progressivement s'accumuler, participant ainsi à la formation d'une peau photoâgée.

En comparant l'effet des expositions répétées sur les N-hTERT et sur les NHK, nous avons donc montré que les kératinocytes se protégeaient des agressions causées par les UVB, soit en enclenchant un mécanisme de différenciation alternative, soit en déclenchant un mécanisme de sénescence prématurée. Il semble que la présence de p16^{INK-4A} joue un rôle déterminant dans le mécanisme déclenchant la sénescence prématurée.

5. Bibliographie

- Abraham, R. T., 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15, 2177-96.
- Angel, P., Szabowski, A., Schorpp-Kistner, M., 2001. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*. 20, 2413-23.
- Bertrand-Vallery, V., Belot, N., Dieu, M., Delaive, E., Ninane, N., Demazy, C., Raes, M., Salmon, M., Poumay, Y., Debacq-Chainiaux, F., Toussaint, O., 2010a. Proteomic profiling of human keratinocytes undergoing UVB-induced alternative differentiation reveals TRlpartite Motif Protein 29 as a survival factor. *PLoS One*. 5, e10462.
- Bertrand-Vallery, V., Boilan, E., Ninane, N., Demazy, C., Friguet, B., Toussaint, O., Poumay, Y., Debacq-Chainiaux, F., 2009. Repeated exposures to UVB induce differentiation rather than senescence of human keratinocytes lacking p16(INK-4A). *Biogerontology*. 11, 167-81.
- Bertrand-Vallery, V., Boilan, E., Ninane, N., Demazy, C., Friguet, B., Toussaint, O., Poumay, Y., Debacq-Chainiaux, F., 2010b. Repeated exposures to UVB induce differentiation rather than senescence of human keratinocytes lacking p16(INK-4A). *Biogerontology*. 11, 167-81.
- Bickers, D. R., Athar, M., 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol*. 126, 2565-75.
- Bikle, D. D., 2008. Vitamin D receptor, UVR, and skin cancer: a potential protective mechanism. *J Invest Dermatol*. 128, 2357-61.
- Blackburn, E. H., 2005. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett*. 579, 859-62.
- Blasco, M. A., 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 6, 611-22.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., Wright, W. E., 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 279, 349-52.
- Boukamp, P., 2005. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis*. 26, 1657-67.
- Boulais, N., Misery, L., 2008. The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol*. 18, 119-27.
- Brack, C., Lithgow, G., Osiewacz, H., Toussaint, O., 2000. EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *EMBO J*. 19, 1929-34.
- Brash, D. E., Ziegler, A., Jonason, A. S., Simon, J. A., Kunala, S., Leffell, D. J., 1996. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 1, 136-42.
- Candi, E., Schmidt, R., Melino, G., 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6, 328-40.
- Chaturvedi, V., Cesnjaj, M., Bacon, P., Panella, J., Choubey, D., Diaz, M. O., Nickoloff, B. J., 2003. Role of INK4a/Arf locus-encoded senescent checkpoints activated in normal and psoriatic keratinocytes. *Am J Pathol*. 162, 161-70.
- Chaturvedi, V., Qin, J. Z., Denning, M. F., Choubey, D., Diaz, M. O., Nickoloff, B. J., 1999. Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. *J Biol Chem*. 274, 23358-67.
- Chen, I. T., Smith, M. L., O'Connor, P. M., Fornace, A. J., Jr., 1995. Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21Waf1/Cip1 with PCNA. *Oncogene*. 11, 1931-7.
- Coulombe, P. A., Omary, M. B., 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 14, 110-22.
- de Lange, T., 2002. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*. 21, 532-40.
- de Winter, S., Vink, A. A., Roza, L., Pavel, S., 2001. Solar-simulated skin adaptation and its effect on subsequent UV-induced epidermal DNA damage. *J Invest Dermatol*. 117, 678-82.
- Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S., Remacle, J., Toussaint, O., 2005. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci*. 118, 743-58.

- Debacq-Chainiaux, F., Pascal, T., Boilan, E., Bastin, C., Bauwens, E., Toussaint, O., 2008. Screening of senescence-associated genes with specific DNA array reveals the role of IGFBP-3 in premature senescence of human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 44, 1817-32.
- Dickson, M. A., Hahn, W. C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J. Y., Weinberg, R. A., Louis, D. N., Li, F. P., Rheinwald, J. G., 2000. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol.* 20, 1436-47.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 9363-7.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Fripiat, C., Mazarati, J. B., Eliaers, F., Remacle, J., Toussaint, O., 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med.* 28, 361-73.
- Fesik, S. W., 2005. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer.* 5, 876-85.
- Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., Voorhees, J. J., 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol.* 138, 1462-70.
- Fisher, G. J., Voorhees, J. J., 1998. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 3, 61-8.
- Fripiat, C., Chen, Q. M., Zdanov, S., Magalhaes, J. P., Remacle, J., Toussaint, O., 2001. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem.* 276, 2531-7.
- Gilchrist, B. A., 1983. In vitro assessment of keratinocyte aging. *J Invest Dermatol.* 81, 184s-9s.
- Gilchrist, B. A., Eller, M. S., 1999. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 4, 35-40.
- Giolomoni, G., Caux, C., Lebecque, S., Dezutter-Dambuyant, C., Ricciardi-Castagnoli, P., 2002. Langerhans cells: still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells. *Trends Immunol.* 23, 6-8.
- Gosselin, K., Deruy, E., Martien, S., Vercamer, C., Bouali, F., Dujardin, T., Slomianny, C., Houel-Renault, L., Chelli, F., De Launoit, Y., Abbadie, C., 2009. Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death. *Am J Pathol.* 174, 423-35.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., Marais, R., 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 445, 851-7.
- Greenlee, R. T., Hill-Harmon, M. B., Murray, T., Thun, M., 2001. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin.* 51, 15-36.
- Hakki, S. S., Hakki, E. E., Nohutcu, R. M., 2009. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by basic fibroblast growth factor and dexamethasone in periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 44, 794-802.
- Hayflick, L., Moorhead, P. S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 25, 585-621.
- Hildesheim, J., Bulavin, D. V., Anver, M. R., Alvord, W. G., Hollander, M. C., Vardanian, L., Fornace, A. J., Jr., 2002. Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Res.* 62, 7305-15.
- Hiraku, Y., Ito, K., Hirakawa, K., Kawanishi, S., 2007. Photosensitized DNA damage and its protection via a novel mechanism. *Photochem Photobiol.* 83, 205-12.
- Hoeijmakers, J. H., 2009. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 361, 1475-85.
- Hohl, D., Mehrel, T., Lichti, U., Turner, M. L., Roop, D. R., Steinert, P. M., 1991. Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J Biol Chem.* 266, 6626-36.

- Hoogstraten, D., Bergink, S., Ng, J. M., Verbiest, V. H., Luijsterburg, M. S., Geverts, B., Raams, A., Dinant, C., Hoeijmakers, J. H., Vermeulen, W., Houtsmuller, A. B., 2008. Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC. *J Cell Sci.* 121, 2850-9.
- Hussein, M. R., 2005. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol.* 32, 191-205.
- Ichihashi, M., Funasaka, Y., Ahmed, N. U., Chakraborty, A. K., Ueda, M., 1998. Efficacy of antioxidant substances and prevention of UV damage, in symposium on skin: J.A Parrish, H. Tagami, T. Ozawa (Eds.), *Interface of a living System*, Elsevier, Amsterdam. 167-175.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., Horikawa, T., 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology.* 189, 21-39.
- Jeyapalan, J. C., Sedivy, J. M., 2008. Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev.* 129, 467-74.
- Johnson, D. G., Walker, C. L., 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39, 295-312.
- Kang, M. K., Guo, W., Park, N. H., 1998. Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres. *Cell Growth Differ.* 9, 85-95.
- Kang, M. K., Kameta, A., Shin, K. H., Baluda, M. A., Kim, H. R., Park, N. H., 2003. Senescence-associated genes in normal human oral keratinocytes. *Exp Cell Res.* 287, 272-81.
- Kanitakis, J., 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 12, 390-9; quiz 400-1.
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., Erusalimsky, J. D., 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 113 (Pt 20), 3613-22.
- Kwon, T. K., Buchholz, M. A., Nordin, A. A., 1996. The cdk2 binding domain of p27Kip correlates with the inhibition of the kinase activity of cdk2/cyclin complexes. *Biochem Biophys Res Commun.* 220, 703-9.
- Lacour, J. P., 2002. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. *Br J Dermatol.* 146 Suppl 61, 17-9.
- Lacour, J. P., Dubois, D., Pisani, A., Ortonne, J. P., 1991. Anatomical mapping of Merkel cells in normal human adult epidermis. *Br J Dermatol.* 125, 535-42.
- Lavrovsky, Y., Chatterjee, B., Clark, R. A., Roy, A. K., 2000. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp Gerontol.* 35, 521-32.
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., Hwang, E. S., 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell.* 5, 187-95.
- Lewis, D. A., Yi, Q., Travers, J. B., Spandau, D. F., 2008. UVB-induced senescence in human keratinocytes requires a functional insulin-like growth factor-1 receptor and p53. *Mol Biol Cell.* 19, 1346-53.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., Stillman, B., 1994. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature.* 371, 534-7.
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 362, 709-15.
- Lippens, S., Hoste, E., Vandenabeele, P., Agostinis, P., Declercq, W., 2009. Cell death in the skin. *Apoptosis.* 14, 549-69.
- Makrantonaki, E., Zouboulis, C. C., 2007. The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). *Exp Gerontol.* 42, 879-86.
- Matsunaga, T., Hieda, K., Nikaido, O., 1991. Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6-4) photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm. *Photochem Photobiol.* 54, 403-10.

- Mazzalupo, S., Wong, P., Martin, P., Coulombe, P. A., 2003. Role for keratins 6 and 17 during wound closure in embryonic mouse skin. *Dev Dyn.* 226, 356-65.
- McMillan, J. R., Akiyama, M., Shimizu, H., 2003. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci.* 31, 169-77.
- Miller, A. J., Mihm, M. C., Jr., 2006. Melanoma. *N Engl J Med.* 355, 51-65.
- Mitchell, J. R., Hoeijmakers, J. H., Niedernhofer, L. J., 2003. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Curr Opin Cell Biol.* 15, 232-40.
- Moll, R., Divo, M., Langbein, L., 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 129, 705-33.
- Moore, J. O., Palep, S. R., Saladi, R. N., Gao, D., Wang, Y., Phelps, R. G., Lebwohl, M. G., Wei, H., 2004. Effects of ultraviolet B exposure on the expression of proliferating cell nuclear antigen in murine skin. *Photochem Photobiol.* 80, 587-95.
- Murphy, G., 1997. Histology of the skin. In: Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson B, eds. *Lever's Histopathology of the Skin*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 5-50.
- Nakagawa, A., Kobayashi, N., Muramatsu, T., Yamashina, Y., Shirai, T., Hashimoto, M. W., Ikenaga, M., Mori, T., 1998. Three-dimensional visualization of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei. *J Invest Dermatol.* 110, 143-8.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., Smith, J. R., 1994. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res.* 211, 90-8.
- Nylander, K., Bourdon, J. C., Bray, S. E., Gibbs, N. K., Kay, R., Hart, I., Hall, P. A., 2000. Transcriptional activation of tyrosinase and TRP-1 by p53 links UV irradiation to the protective tanning response. *J Pathol.* 190, 39-46.
- Paladini, R. D., Takahashi, K., Bravo, N. S., Coulombe, P. A., 1996. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol.* 132, 381-97.
- Pavey, S., Russell, T., Gabrielli, B., 2001. G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation. *Oncogene.* 20, 6103-10.
- Perera, R. J., Koo, S., Bennett, C. F., Dean, N. M., Gupta, N., Qin, J. Z., Nickoloff, B. J., 2006. Defining the transcriptome of accelerated and replicatively senescent keratinocytes reveals links to differentiation, interferon signaling, and Notch related pathways. *J Cell Biochem.* 98, 394-408.
- Poumay, Y., Pittelkow, M. R., 1995. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol.* 104, 271-6.
- Presland, R. B., Dale, B. A., 2000. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 11, 383-408.
- Proksch, E., Brandner, J. M., Jensen, J. M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 17, 1063-72.
- Reichelt, J., Furstenberger, G., Magin, T. M., 2004. Loss of keratin 10 leads to mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, increased keratinocyte turnover, and decreased tumor formation in mice. *J Invest Dermatol.* 123, 973-81.
- Resing, K. A., Johnson, R. S., Walsh, K. A., 1993. Characterization of protease processing sites during conversion of rat profilaggrin to filaggrin. *Biochemistry.* 32, 10036-45.
- Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Durr, P., Wlaschek, M., 2006. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell.* 5, 379-89.
- Rheinwald, J. G., Hahn, W. C., Ramsey, M. R., Wu, J. Y., Guo, Z., Tsao, H., De Luca, M., Catricala, C., O'Toole, K. M., 2002. A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol.* 22, 5157-72.
- Rufer, N., Nabholz, M., 2003. [Telomerase, elixir of life for human cells?]. *Med Sci (Paris).* 19, 345-50.
- Sancar, A., 1995. DNA repair in humans. *Annu Rev Genet.* 29, 69-105.

- Sandhu, C., Peehl, D. M., Slingerland, J., 2000. p16INK4A mediates cyclin dependent kinase 4 and 6 inhibition in senescent prostatic epithelial cells. *Cancer Res.* 60, 2616-22.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A. D., McLean, W. H., 2009. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci.* 122, 1285-94.
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 3, 1101-8.
- Senftleben, U., Karin, M., 2002. The IKK/NF-kappaB pathway. *Crit Care Med.* 30, S18-S26.
- Serre, G., Mils, V., Haftek, M., Vincent, C., Croute, F., Reano, A., Ouhayoun, J. P., Bettinger, S., Soleilhavoup, J. P., 1991. Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J Invest Dermatol.* 97, 1061-72.
- Shay, J. W., Wright, W. E., 2000. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1, 72-6.
- Shay, J. W., Wright, W. E., 2006. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nat Rev Drug Discov.* 5, 577-84.
- Shi, B., Isseroff, R. R., 2005. Epidermal growth factor (EGF)-mediated DNA-binding activity of AP-1 is attenuated in senescent human epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol.* 14, 519-27.
- Steinert, P. M., Marekov, L. N., 1995. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem.* 270, 17702-11.
- Sternlicht, M. D., Werb, Z., 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17, 463-516.
- Suter, M. M., Schulze, K., Bergman, W., Welle, M., Roosje, P., Muller, E. J., 2009. The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet Dermatol.* 20, 515-32.
- Svobodova, A., Walterova, D., Vostalova, J., 2006. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 150, 25-38.
- Swensson, O., Langbein, L., McMillan, J. R., Stevens, H. P., Leigh, I. M., McLean, W. H., Lane, E. B., Eady, R. A., 1998. Specialized keratin expression pattern in human ridged skin as an adaptation to high physical stress. *Br J Dermatol.* 139, 767-75.
- Tarcsa, E., Marekov, L. N., Mei, G., Melino, G., Lee, S. C., Steinert, P. M., 1996. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem.* 271, 30709-16.
- Verschooten, L., Declercq, L., Garmyn, M., 2006. Adaptive response of the skin to UVB damage: role of the p53 protein. *Int J Cosmet Sci.* 28, 1-7.
- Waseem, A., Dogan, B., Tidman, N., Alam, Y., Purkis, P., Jackson, S., Lalli, A., Machesney, M., Leigh, I. M., 1999. Keratin 15 expression in stratified epithelia: downregulation in activated keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 112, 362-9.
- Weinberg, W. C., Denning, M. F., 2002. P21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13, 453-64.
- Wlaschek, M., Tantcheva-Poor, I., Naderi, L., Ma, W., Schneider, L. A., Razi-Wolf, Z., Schuller, J., Scharffetter-Kochanek, K., 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B.* 63, 41-51.
- Zhang, Z., Zhu, W., Lapolla, S. M., Miao, Y., Shao, Y., Falcone, M., Boreham, D., McFarlane, N., Ding, J., Johnson, A. E., Zhang, X. C., Andrews, D. W., Lin, J., Bax forms an oligomer via separate, yet interdependent, surfaces. *J Biol Chem.* 285, 17614-27.
- Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffell, D. J., Simon, J. A., Sharma, H. W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T., Brash, D. E., 1994. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 372, 773-6.

6. Annexe

	Gene name	Gene Symbol	Genebank Acc.
1	Eukaryotic 18S rRNA	18s	X03205.1
2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	NM_002046.3
3	Ribosomal protein L13a	RPL13A	NM_012423.2
4	TATA box binding protein	TBP	NM_003194.3
5	Aquaporin 3	AQP3	NM_004925.3
6	Aquaporin 8	AQP8	NM_001169.2
7	BCL2-associated X protein	BAX	NM_138761.3
8	BCL2-like 1	BCL2L1	NM_001191.2
9	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP3	NM_004346.3
10	Caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP14	NM_012114.1
11	CDC-like kinase 1	CLK1	NM_004071.2
12	Collagen, type I, alpha 1	COL1A1	NM_000088.3
13	Collagen, type I, alpha 2	COL1A2	NM_000089.3
14	Collagen, type III, alpha 1	COL3A1	NM_000090.3
15	Collagen, type IV, alpha 5	COL4A5	NM_033380.1
16	Collagen, type VII, alpha 1	COL7A1	NM_000094.3
17	Collagen, type XVII, alpha 1	COL17A1	NM_000494.3
18	Corneodesmosin	CDSN	NM_001264.3
19	Cyclin D1	CCND1	NM_053056.2
20	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	CDKN1A	NM_078467.1
21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)	CDKN2A	NM_058195.2
22	Cystatin E/M	CST6	NM_001323.2
23	Defensin, beta 1	DEFB1	NM_005218.3
24	Dermatopontin	DPT	NM_001937.3
25	Desmocollin 1	DSC1	NM_024421.2
26	Desmocollin 2	DSC2	NM_024422.3
27	Desmoglein 1	DSG1	NM_001942.2
28	Desmoglein 2	DSG2	NM_001943.3
29	Desmoglein 3	DSG3	NM_001944.2
30	Desmoglein 4	DSG4	NM_177986.2
31	Elastin	ELN	NM_007925.3
32	Envoplakin	EVPL	NM_001988.2
33	Epidermal growth factor	EGF	NM_001963.3
34	Epidermal growth factor receptor	EGFR	NM_005228.3
35	Fibrillin 1	FBN1	NM_000138.3
36	Fibroblast growth factor 2	FGF2	NM_002006.4
37	Fibroblast growth factor 7	FGF7	NM_002009.3
38	Fibromodulin	FMOD	NM_002023.3
39	Fibronectin 1	FN1	NM_212474.1
40	Fibulin 5	FBLN5	NM_006329.3
41	Filaggrin	FLG	NM_002016.1
42	Galactosidase, beta 1	GLB1	NM_001079811.1
43	Gap junction protein, alpha 1, 43kDa	GJA1	NM_000165.3
44	Gap junction protein, beta 2, 26kDa	GJB2	NM_004004.5
45	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	NM_001924.2
46	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	GADD45G	NM_006705.3
47	Growth differentiation factor 15	GDF15	NM_004864.2
48	Heat shock 27kDa protein 1	HSPB1	NM_001540.3

	Gene name	Gene Symbol	Genebank Acc.
49	Heat shock 70kDa protein 1A	HSPA1A	NM_005345.5
50	Heat shock 70kDa protein 4	HSPA4	NM_002154.3
51	Heat shock protein 90kDa alpha, class A member 1	HSP90AA1	NM_005348.3
52	Heat shock protein 90kDa alpha, class B member 1	HSP90AB1	NM_007355.2
53	Heparanase	HPSE	NM_001098540.1
54	Insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	NM_000875.3
55	Insulin-like growth factor binding protein 1	IGFBP1	NM_000596.2
56	Insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	NM_000598.4
57	Insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	NM_000599.3
58	Insulin-like growth factor binding protein 7	IGFBP7	NM_001553.1
59	Integrin, alpha 1	ITGA1	NM_181501.11
60	Integrin, alpha 6	ITGA6	NM_001079818.1
61	Integrin, beta 1	ITGB1	NM_033666.2
62	Integrin, beta 4	ITGB4	NM_001005619.1
63	Integrin, beta 6	ITGB6	NM_000888.3
64	Interleukin 1, alpha	IL1A	NM_000575.3
65	Interleukin 1, beta	IL1B	NM_000576.2
66	Interleukin 8	IL8	NM_000584.2
67	Involucrin	IVL	NM_005547.2
68	Keratin 1	KRT1	NM_006121.3
69	Keratin 4	KRT4	NM_002272.2
70	Keratin 5	KRT5	NM_000424.3
71	Keratin 7	KRT7	NM_005556.3
72	Keratin 10	KRT10	NM_000421.3
73	Keratin 14	KRT14	NM_000526.4
74	Keratin 19	KRT19	NM_002276.4
75	Laminin, alpha 3	LAMA3	NM_198129.1
76	Loricrin	LOR	NM_000427.2
77	Matrilin 2	MATN2	NM_030583.2
78	Matrix metalloproteinase 1	MMP1	NM_002421.2
79	Matrix metalloproteinase 2	MMP2	NM_001127891.1
80	Matrix metalloproteinase 3	MMP3	NM_002422.3
81	Matrix metalloproteinase 9	MMP9	NM_004994.21
82	Methionine sulfoxide reductase A	MSRA	NM_001135670.1
83	Methionine sulfoxide reductase B2	MSRB2	NM_012228.3
84	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	NM_002592.2
85	Retinoic acid receptor, alpha	RARA	NM_001024809.2
86	Retinoic acid receptor, beta	RARB	NM_000965.3
87	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC	NM_003118.2
88	Telomerase reverse transcriptase	TERT	NM_198253.2
89	Tight junction protein 1 (zona occludens 1)	TJP1	NM_175610.2
90	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1	NM_003254.2
91	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2	NM_003255.4
92	Transforming growth factor, beta 1	TGFB1	NM_000660.3
93	Transgelin	TAGLN	NM_003186.3
94	Tumor necrosis factor	TNF	NM_000594.2
95	Tumor protein p53	TP53	NM_001126112.1
96	Tyrosinase-related protein 1	TYRP1	NM_000550.2

Table 1 : Liste de gènes présent sur les cartes microfluidiques TaqMan®. Tous les gènes interviennent dans la biologie de la peau.

